

Aus dem Institut
für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

***Salmonella Typhimurium* DT104**
aus einer mesophilen Biogasanlage:
Überlebenszeiten und experimentelle Inaktivierung
durch ausgewählte organische Säuren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Wilma Staffa
aus Lichtenstein/Sachsen

Leipzig, 2003

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. vet. habil. Gotthold Gäbel

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. habil. Armin Bergmann

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. habil. Armin Bergmann / Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. med. vet. habil. Karsten Fehlhaber / Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerd-Rainer Vollmer / Professur für Biologische Verfahrenstechnik im Fachbereich Flächen- und Stoffrecycling der Fachhochschule Nordhausen (FH)

Tag der Verteidigung: 07. November 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Flüssigmist	3
2.2	Biogas	6
2.2.1	Fermentation organischer Stoffe sowie Bedeutung der Cofermentation	6
2.2.1.1	Prinzipien	6
2.2.1.2	Methanogenese	10
2.2.2	Mesophile anaerobe Fermentation organischer Abprodukte	14
2.2.2.1	Vorteile und Risiken der mesophilen anaeroben Fermentation	14
2.2.2.2	Einflußfaktoren auf Mikroorganismen während der mesophilen anaeroben Fermentation	15
2.3	Indikatororganismen/ mikrobiologische Untersuchungsparameter	18
2.3.1	<i>Enterobacteriaceae</i>	19
2.3.2	<i>E.coli</i> /koliforme Keime	20
2.3.3	Fäkalstreptokokken/Enterokokken	20
2.3.4	Salmonellen	21
2.3.4.1	Humanmedizinische Bedeutung	24
2.3.4.2	Veterinärmedizinische Bedeutung	25
2.3.4.3	Antibiotikaresistenz	27
2.3.4.4	Bekämpfung der Salmonellose	28
3	Material und Methoden	31
3.1	Untersuchungen in einer Biogasanlage und der gülleliefernden Milchviehanlage I sowie der Milchviehanlage II in Oberlungwitz/Sachsen	31
3.1.1	Beschreibung der Biogasanlage und der gülleliefernden Milchviehanlage I, einschließlich Salmonellosestatus	31
3.1.2	Charakterisierung der Milchviehanlage II in Oberlungwitz/ Sachsen	34

3.1.3	Entnahme von Probenmaterial in den Milchviehanlagen I und II sowie der Biogasanlage	36
3.1.4	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der Gülle der Milchviehanlage I, der Fettabscheiderinhalte sowie des Fermentationsmaterials der angegliederten mesophilen anaeroben Biogasanlage	36
3.2	Untersuchungen zur Ermittlung der Überlebenszeiten von <i>S. Typhimurium</i> DT104 unter verschiedenen Laborbedingungen	37
3.2.1	Orientierende Untersuchungen zu Überlebenszeiten nativer Salmonellen im Rinderflüssigmist	37
3.2.2	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in Rinderflüssigmist der Milchviehanlage I, in Substrat der Lagune und in Rinderflüssigmist der Milchviehanlage II bei 7°C und 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)	38
3.2.3	Untersuchungen zum Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in der Gülle der Milchviehanlage I, im Substrat des ersten und zweiten Fermenters und im Material der Lagune bei 37°C	38
3.2.4	Untersuchungen zur Tenazität von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in der flüssigen Phase (Ultrazentrifugation) der Gülle der Milchviehanlage I, der Substrate des ersten und zweiten Fermenters und der Lagune bei 37°C	39
3.2.5	Untersuchungen zum Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in geschlossenen Ampullen im Rinderflüssigmist bei 37°C	40
3.2.6	Untersuchungen zur Inaktivierung von <i>S. Typhimurium</i> DT104 nach dem Zusatz verschiedener organischer Säuren	40
3.2.6.1	Materialien	41
3.2.6.2	Prüfung einzelner Säuren zur Inaktivierung von <i>S. Typhimurium</i> DT104	42
3.2.6.3	Prüfung eines Gemisches organischer Säuren gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104	43
3.3	Untersuchungen auf Auxotrophie verschiedener <i>S. Typhimurium</i>-Stämme	44
3.4	Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit ausgewählter Salmonellenwildisolate und <i>S. Typhimurium</i>-Impfstämme	45

3.5	Bakteriologische Arbeitsmethoden	49
3.5.1	Auswahl der Testkeime	49
3.5.2	Herstellung der Testkeimsuspensionen	49
3.5.2.1	Herstellung der Testkeimsuspensionen (konventionelle Methode)	49
3.5.2.2	Herstellung der Testkeimsuspensionen zur Untersuchung des Einflusses von organischen Säuren auf das Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104	50
3.5.3	Quantitativer Nachweis von Salmonellen mittels KOCH'schem Oberflächenverfahren	50
3.5.4	Quantitativer Nachweis von Salmonellen (MPN-Verfahren)	51
3.5.5	Qualitativer Nachweis der Salmonellen	53
3.5.6	Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl mittels KOCH'schem Oberflächenverfahren	53
3.5.7	Bestimmung der Anzahl der <i>Enterobacteriaceae</i>	54
3.5.8	Bestimmung der Anzahl von <i>Escherichia coli</i>	54
3.5.9	Bestimmung der Anzahl der Enterokokken	55
3.6	Bestimmung des pH-Wertes	55
3.7	Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes	55
3.8	Statistische Berechnungen	56
3.8.1	Berechnung der Regression	56
3.8.2	Bestimmung des D-Wertes	57
3.8.3	Kontrolle der MPN-Meßwerte	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Keimzahlen in der Gülle der Milchviehanlage I, in den Fermentern I und II und der Lagune	58
4.2	Vorkommen von Salmonellen in der Gülle der Milchvieh- anlage I, in Fettabscheiderinhalten und im Fermentationsmaterial der nachgeschalteten Biogasanlage	59
4.3	Untersuchungen zum Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in der Gülle der Milchviehanlage I, im Substrat des Fermenters I und II und im Material der Lagune bei 37°C	61

4.4	Untersuchungen zur Tenazität von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in der flüssigen Phase (Ultrazentrifugation) der Gülle der Milchviehanlage I, der Substrate der Fermenter I und II sowie der Lagune bei 37°C	63
4.5	Überlebenszeiten nativer Salmonellen im Rinderflüssigmist	64
4.6	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 7°C gelagerten Gülle sowie des Substrats nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	65
4.7	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 22°C gelagerten Gülle sowie des Substrats nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	69
4.8	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 37°C gelagerten Gülle nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	72
4.9	Überlebensfähigkeit von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in bei 22°C gelagertem Rinderflüssigmist der Milchviehanlage I	73
4.10	Überlebensfähigkeit von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in bei 37°C gelagertem Rinderflüssigmist der Milchviehanlage I	75
4.11	Überlebensraten von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in geschlossenen Behältnissen bei einer Lagerungstemperatur von 37°C	76
4.12	Inaktivierung von <i>S. Typhimurium</i> DT104 nach Zusatz einzelner organischer Säuren	77
4.12.1	Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration organischer Säuren gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104	77
4.12.2	Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 bei verschiedenen Säurekonzentrationen	79
4.13	Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 nach Zugabe zu einem Säuregemisch	82
4.14	Untersuchungen auf Auxotrophie einiger isolierter Salmonellen	84
4.15	Antibiotikaresistenz und –empfindlichkeit ausgewählter Salmonellenisolate	85
5	Diskussion	90

6	Zusammenfassung	105
7	Summary	108
8	Literaturverzeichnis	110
9	Anhang	131

Abkürzungsverzeichnis

API	Analytischer Profil-Index
BPLS	Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	definitive type
D-Wert	Kehrwert des Betrages des Regressionskoeffizienten
ECBO	enteric cytopathogenic bovine orphan
E.	Escherichia
Ent.	Enterococcus
ERV	equine rhinovirus
FP	Futtermittelprobe
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KID ₅₀	50% kulturinfektiöse Dosis
KP	KOCH'sches Plattenverfahren
kW	Kilowatt
kWh	Kilowattstunde
KZ	Keimzahl
LPS	Lipopolysaccharid
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MPN	most probable number
MVA	Milchviehanlage
MW	Megawatt
n.d.	nicht durchgeführt
n.n.	nicht nachweisbar
PT	Phagentyp
RV	RAPPAPORT und VASSILIADIS
S.	Salmonella
Sc.	Streptococcus
TS	Trockensubstanz
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
UP	Umgebungsprobe
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	In Gülle vorkommende bakterielle Krankheitserreger (STRAUCH 1988)	5
Tabelle 2:	Vergleich zwischen mesophiler und thermophiler anaerober Fermentation (WANDREY und AIVASIDIS 1983).....	15
Tabelle 3:	Parameter der Biogasanlage in Oberlungwitz/Sachsen	32
Tabelle 4:	Vorberichtliche Ergebnisse amtlich angewiesener Kot-, Kotsammel- und Umgebungsuntersuchungen in der Milchviehanlage I nach einer am 24.08.1996 festgestellten Salmonellose, ausgelöst durch <i>S. Typhimurium</i>	35
Tabelle 5:	Gehalt an organischen Säuren (mg/l) während der anaeroben mesophilen Fermentation in Hühnerflüssigmist (SCHEURER 1986) und dem Substrat des I. Fermenters (Rindergülle + Cosubstrate) in Oberlungwitz	41
Tabelle 6:	Aufstellung der in den Versuchen zur Inaktivierung von <i>S. Typhimurium</i> DT104 benutzten Chemikalien.....	41
Tabelle 7:	Getestete Konzentrationen organischer Säuren gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104 (getestete Konzentrationen = x, nicht durchgeführt = n. d.)	42
Tabelle 8:	Zusammensetzung des Säuregemischs zur Prüfung der Inaktivierung von <i>S. Typhimurium</i> DT104	43
Tabelle 9:	Getestete Antibiotika und Konzentration je Testblättchen, Bewertung der Hemmhofdurchmesser (mm).....	46
Tabelle 10:	Gegen Antibiotika getestete Bakterienstämme aus dem Untersuchungsgut der Dissertation plus Kontrollstamm.....	47
Tabelle 11:	Keimzahlen (in KBE/ml), pH-Werte und Trockensubstanzgehalte (%) im Rinderflüssigmist auf dem Weg von der Milchanlage I bis zur Lagune	58
Tabelle 12:	Aus der Milchviehanlage I und der mesophilen Gülleaufbereitung isolierte Anzahl an Salmonellenstämmen in den Jahren 1997-2000	60
Tabelle 13:	Ergebnisse qualitativer und quantitativer Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen in der anfallenden Gülle der Milchviehanlage I, des ersten und zweiten Fermenters der Biogasanlage und der Lagune im Jahr 1998.....	61
Tabelle 14:	Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) nach Zusatz zu einem Säuregemisch	83
Tabelle 15:	Ergebnisse der Antibiotogramme ausgewählter isolierter Salmonellen	87
Tabelle 17:	Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) in der Gülle der Milchviehanlage I, im Substrat des ersten und zweiten Fermenters sowie im Material der Lagune bei einer Lagerungstemperatur von 37°C.....	131

Tabelle 18:	Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) in der flüssigen Phase (Ultrazentrifugation) der Gülle der Milchviehanlage I, der Substrate des ersten und zweiten Fermenters sowie in der Lagune bei einer Lagerungstemperatur von 37°C	132
Tabelle 19:	Orientierende Untersuchungen zu Überlebenszeiten nativer Salmonellen (KBE/ml) in zwei Proben Rinderflüssigmist bei einer Lagerung von 35°C und 6°C	133
Tabelle 20a:	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	134
Tabelle 21a:	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Substrates der Lagune nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	136
Tabelle 22a:	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 7°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	138
Tabelle 23a:	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	140
Tabelle 24a:	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Substrates der Lagune der Milchviehanlage I nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	142
Tabelle 25a:	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen von bei 22°C gelagerter Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	144
Tabelle 26a:	Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 37°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	145
Tabelle 27:	Überlebenszeiten von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in der bei 22°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage I.....	147
Tabelle 28:	Überlebenszeiten von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in der bei 37°C gelageren Rindergülle der Milchviehanlage I.....	149
Tabelle 29:	Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in geschlossenen Behältnissen in Rindergülle bei einer Lagerungstemperatur von 37°C.....	150
Tabelle 30:	Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Ameisensäure gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	151
Tabelle 31:	Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Essigsäure gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104	152
Tabelle 32:	Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Propionsäure gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	152
Tabelle 33:	Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Buttersäure gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104	153
Tabelle 34:	Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Isobuttersäure gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	153
Tabelle 35:	Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Valeriansäure gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	154
Tabelle 36:	Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Isovaleriansäure gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	154

Tabelle 37:	Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Milchsäure gegen <i>S. Typhimurium</i> DT104	155
Tabelle 38:	Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 in verschiedenen Essigsäurekonzentrationen	155
Tabelle 39:	Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 in verschiedenen Essigsäurekonzentrationen (Versuchswiederholung).....	156
Tabelle 40:	Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 in verschiedenen Propionsäurekonzentrationen	157
Tabelle 41:	Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 in verschiedenen Buttersäurekonzentrationen.....	158
Tabelle 42:	Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 in verschiedenen Valeriansäurekonzentrationen	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl und Leistung der Biogasanlagen in Deutschland in den Jahren 1992-2002 (FACHVERBAND BIOGAS e. V., 2002)	7
Abbildung 2: Biogas-Nutzung in Deutschland – Verteilung 2002 (FACHVERBAND BIOGAS e. V., 2002)	7
Abbildung 3: Zwischen- und Endprodukte beim anaeroben Abbau von Biomasse (MAURER und WINKLER 1980, vereinfacht)	13
Abbildung 4: Ansicht der Biogasanlage in Oberlungwitz/Sachsen	33
Abbildung 5: Durchflußschema zu der Biogasanlage in Oberlungwitz/Sachsen	33
Abbildung 6: Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) in der Gülle der Milchviehanlage I, im Substrat des ersten und zweiten Fermenters sowie im Material der Lagune bei einer Lagerungstemperatur von 37°C	62
Abbildung 7: Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) in der flüssigen Phase (Ultrazentrifugation) der Gülle der Milchviehanlage I, der Substrate des ersten und zweiten Fermenters sowie der Lagune bei einer Lagerungstemperatur von 37 °C	63
Abbildung 8: Orientierende Untersuchungen zu Überlebenszeiten nativer Salmonellen (KBE/ml) in zwei Proben Rinderflüssigmist bei einer Lagerung von 35°C und 6°C	65
Abbildung 9: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104 (Versuchswiederholung)	66
Abbildung 10: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Substrates der Lagune nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	68
Abbildung 11: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 7°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104 (Versuchswiederholung)	69
Abbildung 12: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	70
Abbildung 13: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Substrates der Lagune nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104 (Versuchswiederholung)	71
Abbildung 14: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen von bei 22°C gelagerter Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	72
Abbildung 15: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 37°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von <i>S. Typhimurium</i> DT104	73
Abbildung 16: Überlebenszeiten von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in der bei 22°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage I	75
Abbildung 17: Überlebenszeiten von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in der bei 37°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage I	76

Abbildung 18: Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in geschlossenen Behältnissen in Rindergülle bei einer Lagerungstemperatur von 37°C.....	77
Abbildung 19: Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) durch verschiedene Essigsäurekonzentrationen	80
Abbildung 20: Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) durch verschiedene Propionsäurekonzentrationen	81
Abbildung 21: Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) durch verschiedene Buttersäurekonzentrationen.....	81
Abbildung 22: Quantitative Hemmung der <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) durch verschiedene Valerianäurekonzentrationen.....	82
Abbildung 23: Überleben von <i>S. Typhimurium</i> DT104 (in KBE/ml) nach Zusatz zu einem Säuregemisch.....	84
Abbildung 24: <i>S. Typhimurium</i> DT104 wächst auf MUELLER-HINTON-Medium Salmonellen-typisch, der zum Vergleich aufgebrauchte Zoosaloral®-Impfstamm bildet kleine „pin-point“-Kolonien aus.....	85

1 Einleitung und Fragestellung

Die Salmonellen gehören zu den gesundheitspolitisch und ökonomisch bedeutendsten Erregern gastrointestinaler Infektionen des Menschen. Die *Salmonella*-Serovare *Typhimurium* und *Enteritidis* nehmen eine besondere pathogenetische und epidemiologische Stellung ein. Zum dominierenden Epidemiotyp in Europa entwickelte sich zwischen 1984 und 1986 der *Salmonella Enteritidis*-Stamm PT4 (LIESEGANG et al. 1997). Obwohl heute noch über 50% aller Salmonellen durch diesen Epidemiestamm hervorgerufen werden, befindet er sich seit 1992 auf dem Rückzug. Seitdem ist der *S. Enterica*-Stamm DT104 der Serovar *Typhimurium* auf dem Vormarsch. Dessen auffälligstes Charakteristikum ist die Antibiotikamehrfachresistenz, die bei 90% aller Isolate auftritt.

Zur Eindämmung der Salmonellenausbreitung ist die größtmögliche Ausschaltung potentieller Infektionsquellen unerlässlich. Da Infektionsrisiken beispielsweise auch von tierischen Ausscheidungen in Form von Dung, Jauche und Gülle ausgehen, sollte man anstreben, dieses Potential während der Speicherzeit soweit wie möglich zu reduzieren. Eine Möglichkeit hierzu stellt die anaerobe Fermentation mit gleichzeitiger Biogasproduktion dar.

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren unter anderem Untersuchungen von GRUNWALD (1995). Er stellte fest, dass in Rindergülle Salmonellen während der mesophilen Fermentation unter Laborbedingungen nach 6 bzw. 8 Tagen inaktiviert werden. Da hier keine thermische Abtötung der Salmonellen stattfindet, stellt sich die Frage, welche speziellen Faktoren zu der Inaktivierung führen.

In einer Milchviehanlage in Oberlungwitz/Sachsen mit angeschlossener mesophiler Biogasanlage erkrankten Rinder an Salmonellose durch *S. Typhimurium*. Nach einer Impfung der Kälber mit Zoosaloral R® (Impfstoffwerk Dessau-Tornau) waren Salmonellen in der Gülle der Milchviehanlage nachweisbar. Diese Ausgangssituation ermöglichte weitergehende Untersuchungen zur Frage der Salmonelleninaktivierung. Im Einzelnen sollte den folgenden Fragen nachgegangen werden:

- Wie lange überleben Salmonellen in nativem Rinderflüssigmist? Sterben Salmonellen unter natürlichen Bedingungen während der mesophilen anaeroben Fermentation ab?
- Wird das Überleben von Salmonellen in einer mesophilen Biogasanlage durch den pH-Wert und das gleichzeitige Vorkommen anderer Bakterien beeinflusst? Im Rahmen dieser Fragestellung sollte auch die aerobe Gesamtkeimzahl und die Keimzahl ausgewählter Fäkalkeime in der Rindergülle bestimmt werden.
- Welchen Einfluss hat die Temperatur auf die Überlebensfähigkeit von Salmonellen in Rinderflüssigmist und in den einzelnen Kompartimenten einer Biogasanlage? Wie verändert sich die Gesamtkeimzahl in Abhängigkeit von der Temperatur?
- Wie lange überlebt *S. Typhimurium* DT104 in der Gülle bei 22°C und 37°C unter Bedingungen der anaeroben Fermentation im Laborversuch?
- Haben die während der Fermentation in der Biogasanlage anfallenden, kurzkettigen organischen Säuren Einfluss auf das Überleben von *S. Typhimurium* DT104? Wird eine etwaige Beeinflussung durch eine einzelne Säure oder das Säuregemisch hervorgerufen?
- Sind Salmonellen nach der Impfung der Kälber mit Zoosaloral R® in der Gülle und in den Kompartimenten der Biogasanlage nachweisbar? Falls ja, handelt es sich um Impfstämme oder Wildstämme? Zeigen nachgewiesene Salmonellen Antibiotikaresistenzen? Verändern auxotrophe Mutanten der Salmonellen während der Passage durch eine mesophile Biogasanlage ihre Antibiotikaresistenz?

2 Literaturübersicht

2.1 Flüssigmist

Unter Gülle oder Flüssigmist versteht man das Gemenge, das in der Landwirtschaft aus den tierischen Ausscheidungen Kot und Harn anfällt und mit unterschiedlichen Mengen Wasser sowie Futter- und Einstreuresten versetzt ist (STRAUCH 1990a). Durch die Lagerung behält Gülle ihre Fließfähigkeit oder sie wird zum Ausbringen wieder verflüssigt (HÜFFMEIER 1984).

Da die Zusammensetzung des Flüssigmistes und die Menge der Ausscheidungen von zahlreichen individuellen Einflussgrößen wie Tierart, Haltung, Fütterung, Jahreszeit, Geschlecht, Bewegung, Angst und Stress der Tiere bestimmt wird (STRAUCH 1990a; TIETJEN 1978; VETTER und STEFFENS 1986), ist es schwierig, die genaue Menge der anfallenden Gülle vorauszusagen. Als Leitzahlen werden für die Berechnung der täglichen Menge tierischer Ausscheidungen 9% des Körpergewichts bei Rindern, 6% bei Schweinen und 10% bei Geflügel angegeben (TIETJEN 1978).

In der Bundesrepublik Deutschland fallen jährlich etwa 190 Millionen Tonnen Gülle aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung an (DÖHLER et al. 1999). Dies entspricht einem Nährstoffpotential von 630 000 t Stickstoff, 160 000 t Phosphor und 530 000 t Kalium (METZGER 1994). Obwohl Flüssigmist folglich einen wertvollen Wirtschaftsdünger darstellt, können von ihm eine Reihe von Umweltbelastungen und gesundheitlichen Risiken ausgehen. Daher ist neben der Reduzierung des Pflanzennährstoffgehaltes der Aspekt der Hygienisierung von großer Bedeutung für die allgemeine Seuchenprophylaxe (HEROLD et al. 1999).

Besonders in Regionen mit einer hohen Besatzdichte an landwirtschaftlichen Betrieben kann der Boden und in der Folge das Grundwasser mit überhöhten Gaben an organischem Dünger belastet werden (STRAUCH 1990b). Hierbei steht die Stickstoffauswaschung im Vordergrund, die besonders bei leichten, sorptionsschwachen Böden mit hohem Grundwasserstand und fehlender Vegetationsdecke im Herbst und Winter zu hohen Nitratbelastungen im Grundwasser führt (METZGER 1994).

An Luftverunreinigungen ist die Emission von Methan dominierend. Die Gesamtemission von Methan aus tierischen Exkrementen wird in Deutschland auf jährlich 800 000 t/a geschätzt (BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT 1993). Dagegen betragen die stoffwechselbedingten Methanemissionen der Nutztierhaltung in Deutschland ca. 1,4 Mio t/a, wobei der weitaus überwiegende Anteil dieser Emissionen auf die Haltung von Rindern zurückzuführen ist. Der Anteil der anthropogenen Methanemissionen aus der Landwirtschaft wird auf etwa 34% geschätzt (BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT 1993). Als wichtigster Methanbildungsprozess bei Wiederkäuern ist die Reduktion von Kohlendioxid unter Wasserstoffaufnahme zu Methan im Pansen unter anaeroben Bedingungen anzusehen (AHLGRIMM und GÄDEKEN 1990). Methan wird nur sehr langsam unter dem Einfluss von Sonnenlicht, Ozon und freien Radikalen zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert. Es ist mit 20% am Treibhauseffekt beteiligt und trägt dadurch, dass es für seine Oxidation Ozon verbraucht, zur Vergrößerung des Ozonlochs in der Stratosphäre bei (SCHULZ und EDER 2001).

Durch mögliche Kontamination der Gülle mit bakteriellen, viralen und parasitären Krankheitserregern kommt ihr ebenfalls epidemiologische Bedeutung zu. In diesem Zusammenhang ist der geringe Trockensubstanzgehalt entscheidend, denn im Gegensatz zum Festmist findet während der Lagerung keine durch Selbsterhitzung eingeleitete Abtötung von Krankheitserregern statt. In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Keime, die in Gülle vorhanden sein können, zusammengestellt (STRAUCH 1988):

Tabelle 1: In Gülle vorkommende bakterielle Krankheitserreger (STRAUCH 1988)

Rindergülle	Schweinegülle	Hühnerkot
Salmonellen	Salmonellen	Salmonellen
Brucellen	Brucellen	Pasteurellen
Milzbrandbakterien	Leptospiren	Clostridien
Leptospiren	Treponemen	Listerien
Mykobakterien	Mykobakterien	Mykobakterien
enteropathogene E. coli	Rotlaufbakterien	

Von den genannten, mit der Gülle verbreiteten Bakterien sind die Salmonellen am wichtigsten in Bezug auf eine gesundheitliche Gefährdung der Menschen und Tiere und können als Modell für andere bakterielle Infektionskrankheiten bzw. als Indikatorkeime herangezogen werden (s. Kap. 2.3).

Virale Erreger weisen aufgrund fehlender Vermehrungsmöglichkeiten außerhalb ihrer Wirtsorganismen nur geringe Virustiter in Gülle auf, dennoch konnten beispielsweise die Erreger der Aujeszky'schen Erkrankung über 111 Tage bei Raumtemperatur nachgewiesen werden (MACK 1986). Auch die Erreger folgender Viruskrankheiten können in tierischen Fäkalien auftreten und stellen eine potentielle Infektionsquelle dar: Maul- und Klauenseuche, Schweinepest, Swine Vesicular Disease, Schweineinfluenza, Transmissible Gastroenteritis, Rotavirus-Infektionen, Teschener Erkrankung, Bluetongue, Atypische Geflügelpest (STRAUCH 1988). An parasitären Infektionserregern, die in Gülle nachgewiesen wurden, sind Spulwürmer, Palisadenwürmer, Saugwürmer, Leberegel, Lungenwürmer und Magenwürmer zu nennen (PHILIPP 1998; STRAUCH et al. 1993).

Aufgrund der potentiellen Belastung der Gülle mit Krankheitserregern wurde eine Fülle von biologischen, physikalischen, technischen und chemischen Verfahren zur hygienischen Aufbereitung von tierischen Exkrementen entwickelt (PHILIPP 1998). Auch innerhalb der im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchten Biogasanlage stellt die Hygienisierung des Flüssigmistes einen wesentlichen Teilaspekt dar.

2.2 Biogas

2.2.1 Fermentation organischer Stoffe sowie Bedeutung der Cofermentation

2.2.1.1 Prinzipien

Bei der konzentrierten, einstreulosen Haltung großer Tierbestände kommt der anaeroben Gülleaufbereitung mit Biogasgewinnung eine besondere Bedeutung zu, und die Zahl der Biogasanlagen hat sich in Deutschland seit 1992 mehr als verzehnfacht (DA COSTA GOMEZ 2002, Abbildung 1). Die Ursachen für diesen Trend sind die Bemühungen zur CO₂-Reduktion sowie die Endlichkeit und steigenden Preise fossiler Energien. Daher hat die Europäische Union festgelegt, dass bis zum Jahr 2010 der Anteil der regenerativen Energien von derzeit sechs auf zwölf Prozent verdoppelt werden soll, und die Bundesländer haben zahlreiche Beihilfeprogramme zur Förderung der Erzeugung und der energetischen Nutzung von Biogas eingerichtet (KÖNIG 2002). Bisher wurden Biogasanlagen vor allem in Bayern, Baden-Württemberg, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen eingerichtet und genutzt, während die übrigen Bundesländer – und hier vor allem die ehemalige DDR – bezüglich der Anlagenzahl und der installierten elektrischen Leistung in Megawatt (MW) noch deutlich unterrepräsentiert sind (Abbildung 2).

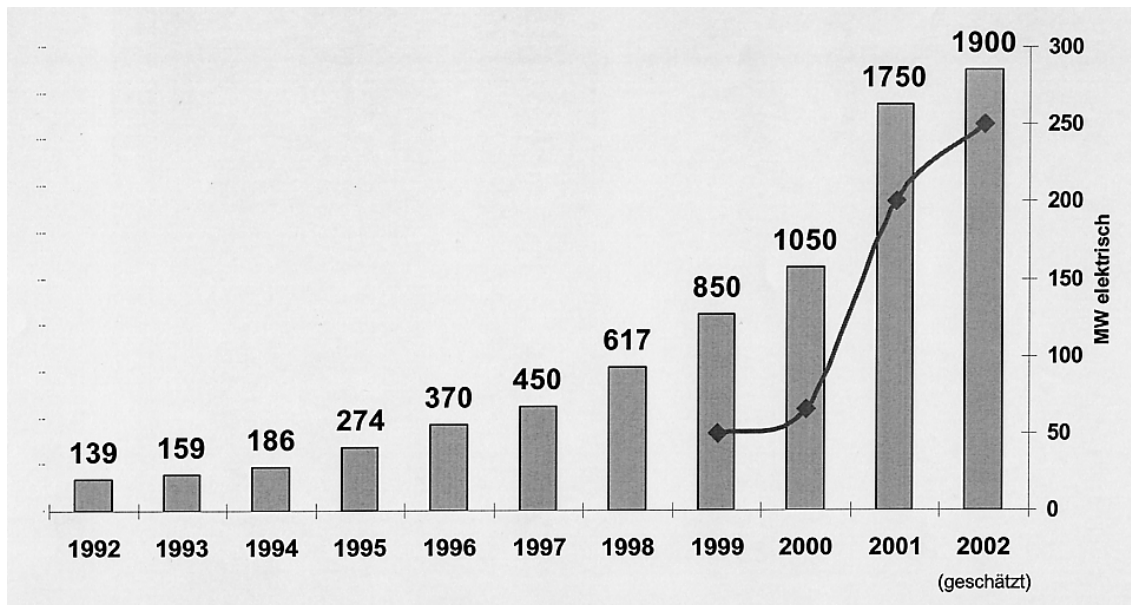


Abbildung 1: Anzahl und Leistung der Biogasanlagen in Deutschland in den Jahren 1992-2002
(FACHVERBAND BIOGAS e. V., 2002)

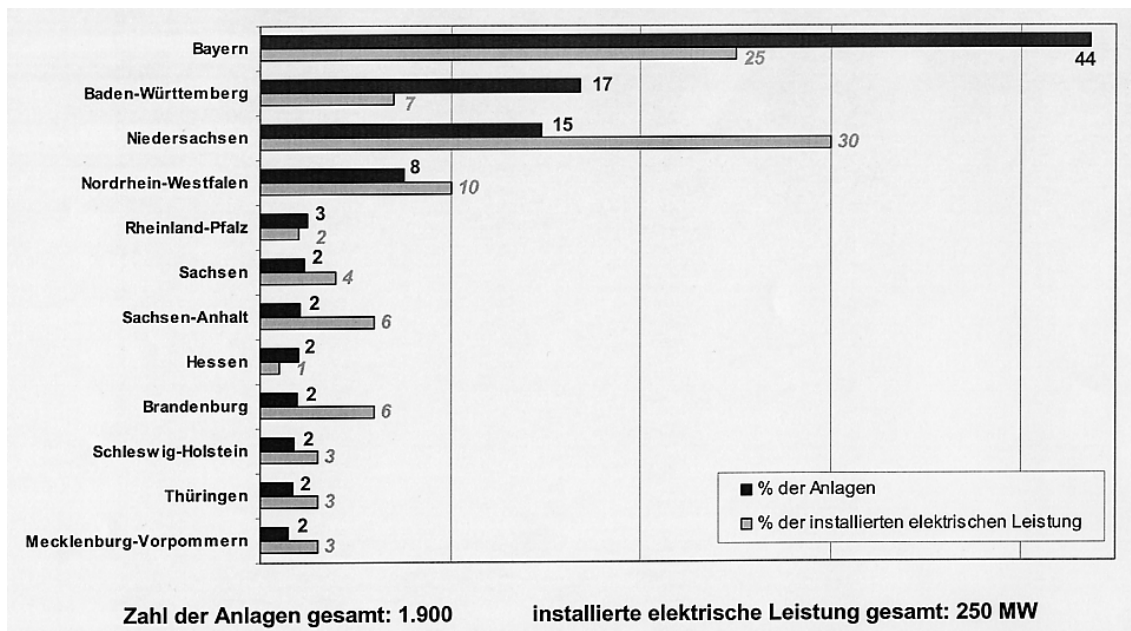


Abbildung 2: Biogas-Nutzung in Deutschland – Verteilung 2002
(FACHVERBAND BIOGAS e. V., 2002)

Folgende Vorteile von Biogasanlagen lassen sich zusammenfassen:

- Regenerative Energiequelle: Mit Hilfe von Biogasanlagen sind örtliche Überschüsse an organischer Substanz als regenerative Energiequellen erschließbar. Je Kilogramm organischer Trockensubstanz lassen sich 0,3 bis 0,6 m³ Biogas mit 50-80% Methananteil erschließen (WEDEKIND et al. 1988). Die Gasausbeute von Rindergülle beträgt durchschnittlich 0,1 - 0,15 m³ CH₄/kg Trockensubstanz (KIRCHNER 1995).
- Reduzierung von Luftschadstoffen: Die Emissionen von Methan bei der offenen Lagerung von Gülle und Mist werden drastisch eingeschränkt. Zusätzlich ist die energetische Nutzung von Biogas im Gegensatz zur Verbrennung von Erdgas, Flüssiggas, Öl und Kohle CO₂-neutral, weil sich das entstehende CO₂ im natürlichen Kohlenstoffkreislauf bewegt und von den Pflanzen wieder verbraucht wird. Es trägt dadurch nicht wie das aus fossilen Rohstoffen stammende CO₂ zur Nettozunahme der CO₂-Konzentration der Atmosphäre bei (SCHULZ und EDER 2001).
- Abbau umweltbelastender Geruchsstoffe: Ein großer Teil der Geruchskomponenten wie Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Indol und Skatol ist leicht abbaubar und geht durch die anaerobe Fermentation stark zurück. Hierdurch erfolgt eine Reduzierung der Geruchsquantität um 40-50% (WENZLAFF 1981).
- Der Vergärungsprozess reduziert die Anzahl pathogener Keime und die Keimfähigkeit von Unkrautsamen (FACHVERBAND BIOGAS e. V. 2002).
- Verbesserung der Pflanzenverfügbarkeit: Durch den Abbau organischer Substanzen werden Nährstoffe schneller freigesetzt und sind daher leichter pflanzenverfügbar. Besonders der Anteil des Ammoniumstickstoffs steigt deutlich an (VETTER und STEFFENS 1986). Biogasgülle hat eine bessere Düngewirkung als unvergorene Gülle, da sich durch die Mineralisierung das C/N-Verhältnis einengt und die Gülle pflanzenverträglicher wird. Sie eignet sich dann sogar als Kopfdünger und ist während der Wachstumsphase einsetzbar. Dünge- und Pflanzenschutzmittel werden eingespart. Bio-

gasgülle kann effektiv Mineraldünger substituieren und Trinkwasser schonen (FACHVERBAND BIOGAS e. V. 2002).

- Es entsteht ein homogenes Produkt, das eine geringere Viskosität durch Abnahme des Trockensubstanzgehaltes aufweist und dadurch gut pumpfähig ist (WEDEKIND et al. 1988).
- Die Wirtschaftsfähigkeit des ländlichen Raumes nimmt wieder zu (FACHVERBAND BIOGAS e. V. 2002). Statt organische Reststoffe nur zu entsorgen, werden Energie erzeugt und Nährstoffe genutzt. Damit trägt die Biogastechnik dem Gedanken der umweltgerechten Kreislaufwirtschaft und der dezentralen Abfallverwertung Rechnung. Landwirte, die z. B. organische Abfälle von Kommunen mitverwerten, erhalten dadurch eine neue siedlungspolitische Funktion (FACHVERBAND BIOGAS e. V. 2002).
- Das Klimaschutzziel, den Anteil erneuerbarer Energien bis zum Jahr 2010 mindestens zu verdoppeln, wird unterstützt (FACHVERBAND BIOGAS e. V. 2002).
- Durch Kraft-Wärme-Kopplung erfolgt die Erzeugung von thermischer und elektrischer Energie. Diese kann zur Deckung des Wärmebedarfs der Gebäudeheizung und Brauchwassererwärmung genutzt werden. Die Erzeugung elektrischer Energie wird für Anlagen bis einschließlich einer installierten Leistung von 500 Kilowatt (kW) mit mindestens 0,10 Euro/kWh vergütet (FACHVERBAND BIOGAS e. V. 2002).

Die Fermentation organischer Substanzen geschieht in der Natur unter Sauerstoffabschluss und im feuchten Milieu durch Methanbakterien bei Temperaturen zwischen 0°C und 70°C. Im Gegensatz zur Kompostierung entsteht beim Verfaulen keine Wärme, dafür jedoch das brennbare Methangas; außerdem werden Kohlendioxid und Wasser sowie einige Spurengase und Humusstoffe erzeugt (SCHULZ und EDER 2001). In Biogasanlagen findet der Methangärungsprozess unter kontrollierten Prozessbedingungen statt. Reste abgestorbener oder Exkremente lebender Organismen werden bei Vorhandensein einer Mindestmenge an Feuchtigkeit unter Sauerstoffabschluss, in schwach alkali-

schem Milieu und bei Temperaturen über 4°C dem Abbauprozess der Bakterien unterworfen. Am Ende dieses Konvertierungsprozesses liegen ein technisch nutzbares, methanhaltiges Brenngas – das Biogas – und ein mikrobiell nur noch schwer angreifbarer, hochmolekularer Faulschlamm vor, der sich gut als Humusdünger eignet (BIET 1995). Die Zusammensetzung des Biogases schwankt in Abhängigkeit vom Substrat und dem gewählten Biogasverfahren. Der Methangehalt liegt zwischen 50-75% und der CO₂-Gehalt zwischen 16-44%. Zusätzlich sind im Biogas bis zu 1% Schwefelwasserstoff und 6-8% an sogenannten Restgasen enthalten (Ammoniak, elementarer Stickstoff, Wasserstoff und Sauerstoff) (SCHULZ und EDER 2001).

Seit 1992 wird zunehmend die sogenannte Cofermentation praktiziert, d. h. die Vergärung von Gülle oder Festmist zusammen mit organischen Stoffen, die nicht in der Viehwirtschaft anfallen. Für den Betreiber einer Biogasanlage ist die Cofermentation wirtschaftlich interessant, weil das Kosten-Nutzen-Verhältnis der Biogaserzeugung durch die höheren Gaserträge und die möglichen Einnahmen von Entsorgungsgebühren erheblich verbessert werden kann (BASERGA 1998). In der Landwirtschaft kommen als Cosubstrate organische Reststoffe wie Silagesickersaft, Brennereischlempe, Gemüseabfälle, Molkereiabfälle und kommunaler Grasschnitt in Frage. Am häufigsten werden fetthaltige Substrate genommen (KRIEG 2001). Beispielsweise liefert die Vergärung von Altfett einen Gasertrag von 800 m³ pro Tonne; dies entspricht dem 20- bis 30-fachen Ertrag aus Rindergülle allein (BASERGA 1998). Die verwertbaren Mengen an Cosubstraten legt die Düngeverordnung von 1996 eindeutig fest (KRIEG 2001).

Anaerobe Behandlungen sollten wegen der hohen Abbauraten der nativorganischen Substanz und des emissionsarmen Endproduktes für den technischen Einsatz zur mechanisch-biologischen Restabfallbehandlung in Betracht gezogen werden (VOLLMER 2000).

2.2.1.2 Methanogenese

Die Methanbildung steht am Ende einer vierstufigen Kaskade, während derer die organische Substanz unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff zerlegt wird.

In der 1. Phase (Hydrolyse – Verflüssigung) werden hochmolekulare Verbindungen wie beispielsweise Polysaccharide, Fette sowie Proteine und Nukleinsäuren in die niedermolekularen Spaltprodukte Mono-, Disaccharide, Aminosäuren, langkettige Fettsäuren und Glycerin aufgetrennt. Die hierfür erforderlichen exogenen Enzyme stammen von fakultativ und obligat anaeroben Bakterien, die bereits im Rohmaterial, wie tierischem Kot, in hohen Keimzahlen vorhanden sind (MAURER und WINKLER 1980; SCHERER 1995). Die in Wasser gelösten Spaltprodukte können durch die Zellmembranen in die Bakterienzelle eindringen und hier als Substrate für die weitere Verstoffwechselung dienen (SIXT 1983).

Die Hydrolyse stellt innerhalb der vierstufigen Methanbildung den langsamsten Schritt dar und bestimmt folglich die Aufenthaltsdauer eines Substrates in der Biogasanlage.

Die durch die hydrolytische Spaltung entstandenen Bausteine werden in der 2. Phase, der Fermentation oder Versäuerungsphase, in mehreren aufeinanderfolgenden Fermentationsschritten weiter vergoren. Es entstehen kurzkettige organische Karbonsäuren (Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Valeriansäure, Isovaleriansäure, verzweigte Fettsäuren usw.) aber auch Alkohole, Ammoniak, Kohlendioxid und Wasserstoff (STADLBAUER 1982). Die Effektivität dieser „Versäuerung“ wird durch den Wasserstoffpartialdruck beeinflusst, und mit steigendem Wasserstoffgehalt nimmt auch die Menge der gebildeten Propion- und Buttersäure zu. Während dieser Phase sind die beteiligten Bakterien fakultativ anaerob, d. h. sie nutzen entweder gelösten Sauerstoff oder anorganische Verbindungen wie Nitrate oder Sulfate als Wasserstoffakzeptor.

Fettsäuren werden durch β -Oxidation schrittweise um C_2 -Einheiten bis hin zu Acetat reduziert, Aminosäuren durch gekoppelte Oxidations-Reduktions-Reaktionen zu Acetat, Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut (SIXT 1983).

Der folgende 3. Schritt, die Acetogenese, bewirkt, dass die bisher entstandenen sauren Substrate von den Methan-bildenden Mikroorganismen verwertet werden können. Die Acetogenese stellt den thermodynamisch schwierigsten Ab-

schnitt des Gesamtabbaus dar, da die Reaktionen nur dann ablaufen können, wenn der Wasserstoffpartialdruck sehr niedrig ist (SCHERER 1995).

Acetogene Bakterien bauen die vorhandene Propionsäure und Buttersäure, sowie Alkohole, zu Acetat, Ammoniak und Kohlendioxid ab (STADLBAUER 1982). Als Stoffwechselprodukt entsteht Wasserstoff, der in zunehmenden Konzentrationen die Bioaktivität dieser obligat protonenreduzierenden Bakterien hemmt. Daher ist die Gegenwart von Methanbakterien erforderlich, die den anfallenden Wasserstoff durch eine Reaktion mit Kohlendioxid entfernen, d. h. es besteht eine obligate Symbiose zu den Methanbildnern der 4. Phase, der Methanogenese.

Die Methan-bildenden Bakterien sind Substratspezialisten, d. h. sie können nur sehr wenige Substanzen umsetzen und benötigen dabei Wasserstoff als Energiequelle und Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle und Elektronenakzeptor. Durch den Verbrauch an Wasserstoff wirken sie einer Übersäuerung entgegen. Obwohl alle Methanbakterien mit Wasserstoff und Kohlendioxid als einziger Energiequelle wachsen können, sind einige Spezies in der Lage die Salze der Ameisen- und Essigsäure sowie Methanol für die Methanproduktion zu verwerten (THAUER und FUCHS 1979). Obwohl die Methanbildung aus Kohlendioxid am effektivsten ist, stammen nur 27-30% des gebildeten Methans aus CO_2 , während 70% aus Acetat gebildet wird.

In der folgenden Abbildung 3 sind die wichtigsten Vorgänge während der anaeroben Methanbildung zusammenfassend dargestellt.

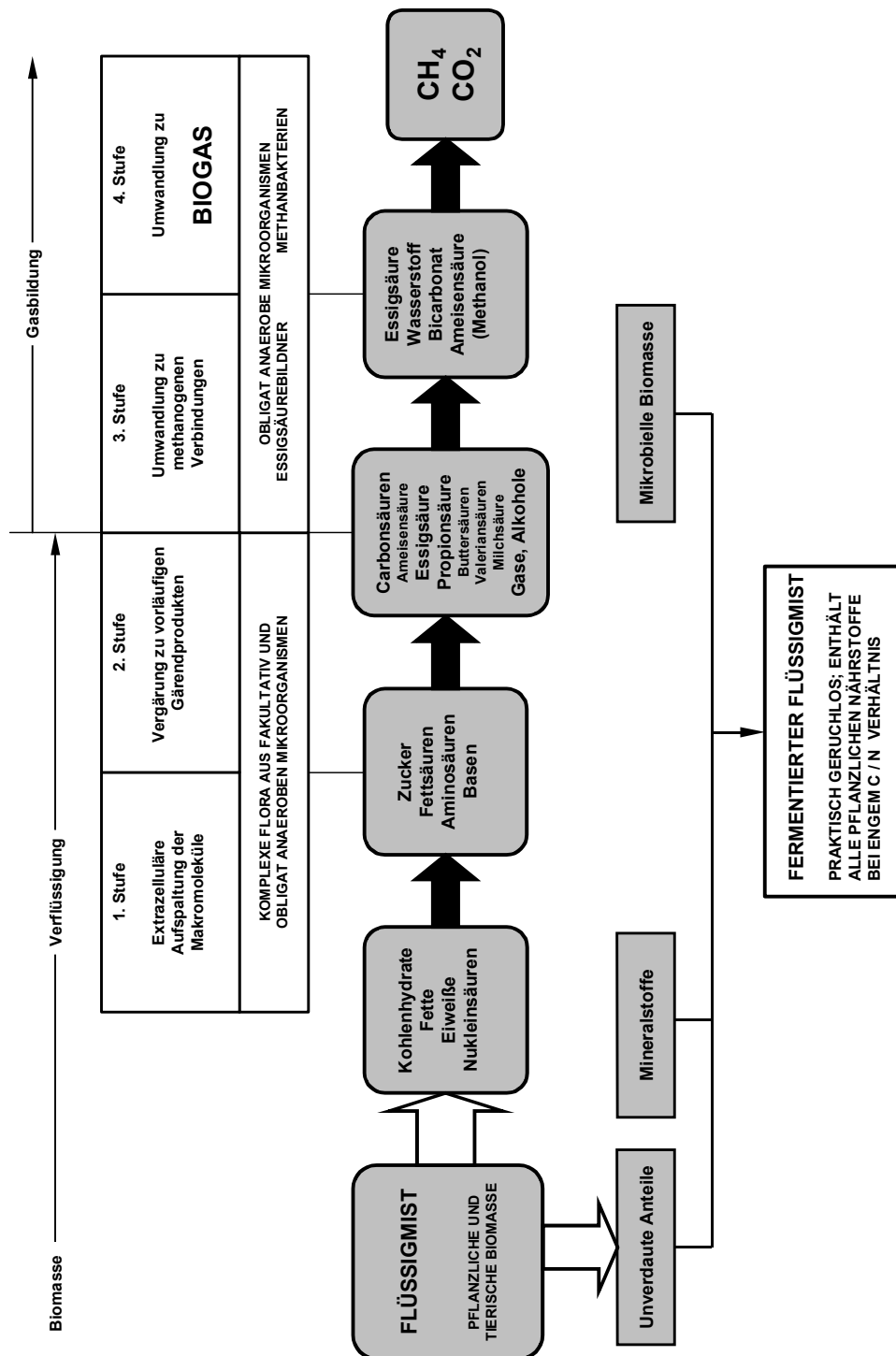


Abbildung 3: Zwischen- und Endprodukte beim anaeroben Abbau von Biomasse (MAURER und WINKLER 1980, vereinfacht)

Die Methanbakterien lassen sich je nach dem Optimum ihrer Stoffwechselaktivitäten in zwei Gruppen einteilen (WENZLAFF 1981):

- Mesophile Arten mit einem Temperaturoptimum zwischen 20°C und 40°C,
- Thermophile Arten mit einem Temperaturoptimum zwischen 50°C und 60°C.

Der anaerobe Abbau der Biomasse bis hin zur Biogasbildung kann verfahrenstechnisch ein- oder zweistufig geführt werden. Beim einstufigen Verfahren laufen die oben beschriebenen vier Phasen der Methanogenese in einem einzigen Faulraum ab, und zwar bei vollständig durchmischten Anlagen zeitlich und räumlich parallel, bei in Fließrichtung nicht durchmischten Anlagen dagegen räumlich hintereinander. Bei zweistufigen Verfahren laufen Acetogenese und Methanogenese räumlich getrennt ab. Die Vorteile des zweistufigen Verfahrens sind einerseits eine Energieeinsparung durch Wärmeaustauscher während der Fermentation, andererseits eine größere Stabilität und Energieausbeute (SCHULZ und EDER 2001).

2.2.2 Mesophile anaerobe Fermentation organischer Abprodukte

2.2.2.1 Vorteile und Risiken der mesophilen anaeroben Fermentation

In der folgenden Tabelle sind die Vor- und Nachteile bei der mesophilen und thermophilen anaeroben Fermentation für den Betreiber einer Biogasanlage gegenübergestellt. Demnach ergibt sich bezüglich der mikrobiellen Aktivität ein Vorteil der thermophilen Anlagen. Die Prozessstabilität ist bei mesophiler Betriebsweise größer. Wenn es um den verstärkten Abbau pathogener Mikroorganismen in der Gülle geht, bietet die thermophile Prozessführung Vorteile. Dem steht allerdings ein erhöhter Wärmebedarf für die Substraterwärmung gegenüber (WANDREY und AIVASIDIS 1983).

Tabelle 2: Vergleich zwischen mesophiler und thermophiler anaerober Fermentation (WANDREY und AIVASIDIS 1983)

	Mesophil	Thermophil
Aktivität/Gasausbeute	○	+
Stabilität	+	-
Hygienisierung	○	+
Wärmebedarf	+	-

+ vorteilhaft, - ungünstig, ○ mittelmäßig

Als Nachteil der mesophilen Vergärung ist anzusehen, dass aufgrund der unzureichenden antimikrobiellen Wirkung eine vorbereitende Hygienisierung erforderlich ist. Diese kann beispielsweise durch einstündiges Erhitzen auf 85°C in Hygienisierungstanks erfolgen (EDER 2001). Werden Rindergülle Co-substrate zur gemeinsamen Vergärung beigegeben, ist die Tenazität der angewandten Testorganismen im Anaerobreaktor um das Doppelte erhöht. Während Enteric cytopathogenic bovine orphan-Virus (ECBO-Virus) nach 9 Stunden und *S. Enteritidis* bzw. *S. Senftenberg* nach 11 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden konnten, war beim equinen Rhinovirus (ERV-Virus) nach 12 Stunden Expositionszeit im Anaerobreaktor noch ein Virustiter in der Größenordnung von log 10 KID 50/Keimträger nachweisbar (PHILIPP und MARTENS 2000). Werden dem Flüssigdünger Cosubstrate zugefügt, die ein seuchenhygienisches Risiko mitbringen, verlangt der Gesetzgeber laut Bio-Abfallverordnung daher eine Vorbehandlung (EDER 2001).

2.2.2.2 Einflussfaktoren auf Mikroorganismen während der mesophilen anaeroben Fermentation

Je höher die Behandlungstemperatur, um so höher ist die Inaktivierungswirkung der Biogasanlage auf Mikroorganismen. Erzielen mesophil betriebene

Anlagen nur eine durchschnittliche Keimreduktion von ein bis zwei Zehnerpotenzen, so wird bei thermophilen Anlagen schon eine ausreichende Hygienisierung, d. h. eine Reduktion des Keimgehaltes um vier Zehnerpotenzen erreicht (BENDIXEN 1998; EDER 2001; PHILIPP 1998; PHILIPP und MARTENS 2000).

Bei der mesophilen anaeroben Fermentation findet eine Reduzierung des Keimgehaltes im Vergleich zur Rohgülle, jedoch keine Abtötung pathogener Mikroorganismen statt (STRAUCH 1981; STROMBERG 1984). Durch eine anaerobe Filterbehandlung bei 35°C konnte in Schweinegülle eine Reduktion des Gehaltes an *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Str. faecalis* und koliformen Keimen um 0,5-2,1 Zehnerpotenzen erzielt werden (OLSEN 1988). Andere Untersucher wiesen eine Inaktivierung von *S. Senftenberg* in Hühnerkot bei 35°C innerhalb vier Tagen nach (HEEL 1983). In Rindergülle konnte *S. Typhimurium* bei 37°C nach 10 Tagen nicht mehr isoliert werden (GADRE et al. 1986).

Bei einem Vergleich zwischen mesophiler und thermophiler Vergärung bewirkte in Schweinegülle die mesophile Behandlung eine Reduktion der Salmonellen und Enterobakterien um etwa drei Zehnerpotenzen, während mit der thermophilen Faulung eine vollständige Abtötung erreicht wurde. In Rindergülle war ein geringerer entseuchender Effekt zu beobachten. Die mesophile Faulung reduzierte Salmonellen und Enterobakterien hier um etwa eine Zehnerpotenz, die Behandlung bei 55°C konnte diese Keime dagegen fast vollständig eliminieren (RÜCKERT 1991).

GRUNWALD (1995) stellte fest, dass in Rindergülle Salmonellen unter Laborbedingungen während der mesophilen Fermentation nach sechs bis acht Tagen inaktiviert werden. Die in hohen Konzentrationen während der Fermentation anfallenden Karbonsäuren bedingen eine Keimabtötung, da ein Einfluss der Temperatur bei der mesophilen Behandlung auszuschließen ist.

In Untersuchungen zum anaeroben Abbau von Hühnerflüssigmist wurden nach 20tägiger Lagerung 21 324 mg/l Essigsäure nachgewiesen, bei der Cofermentation von Hühner- und Rindergülle waren es 1 330 mg/l, bei Hühner-/Schweinegülle 950 mg/l. Auch Propionsäure wurde in einer hohen Konzentration gebildet (Hühnergülle: 9 741 mg/l, Hühner-/Rindergülle: 500 mg/l, Hühner-/Schweinegülle: 450 mg/l). Buttersäure, Isobuttersäure, Valeriansäure

und Isovaleriansäure wurden in der reinen Hühnergülle ebenfalls in größeren Mengen bis zu 2 700 mg/l gebildet, während diese Säuren bei der Cofermentation mit Rinder- bzw. Schweinegülle nicht mehr nachweisbar waren (SCHEURER 1986). Die Säurekonzentrationen werden jedoch von zahlreichen Faktoren beeinflusst (Bakterienflora, Temperatur, pH-Wert), so dass die Angaben zur Menge der gebildeten Säuren eine hohe Variationsbreite aufweisen (vgl. Tabelle 16, PATNA und JUI 1985; KUTZNESOV et al. 1988; SÜSSENBACH 1988; KOBAYASHI et al. 1989; GRIFFIN et al. 1998).

2.3 Indikatororganismen/ mikrobiologische Untersuchungsparameter

Indikatororganismen zeigen den hygienischen Status eines Produktes an, wobei eine Infektionsgefahr nicht zwangsläufig bestehen muss. Aus dem Vorhandensein bestimmter Keime bzw. Keimgruppen lassen sich Folgerungen für die Bewertung des Produktes ziehen. Beispielsweise deutet das Wachstum von *E. coli* auf eine Kontamination mit enteropathogenen Mikroorganismen hin, da dieser Keim fast ausschließlich in Substraten fäkalen Ursprungs vorkommt (MOSSSEL 1982). Man unterscheidet zwischen direkten und indirekten Indikatorkeimen. Direkte Indikatorkeime sind solche, die selbst obligat oder fakultativ pathogen sind, während indirekte Indikatorkeime das Vorkommen pathogener Keime lediglich vermuten lassen (METHLING und MEHLHORN 1985).

Indikatorkeime sollten folgende Eigenschaften besitzen (PIKE 1984):

- Der Nachweis sollte mittels einfacher, zuverlässiger und vorzugsweise standardisierter Untersuchungsmethoden möglich sein.
- Die Keime sollen zahlreich im Untersuchungsmaterial vorhanden sein.
- Es sollte sich um eine Spezies, allenfalls um eine kleine Gruppe eng verwandter Spezies mit ähnlicher Resistenz handeln.
- Die Keime sollten gegenüber verschiedenen Behandlungsprozessen gleiche oder sogar höhere Resistenz besitzen als die relevanten Krankheitserreger.
- Sie sollen in der Lage sein, eine Wiederbekeimung nach der Behandlung anzuzeigen.

Die Anforderungen an Indikatorkeime sind aber auch von der Indikation abhängig. Beispielsweise eignet sich *E. coli* für den Nachweis einer fäkalen Kontamination von Trinkwasser (BUSSE 1985), aber auch als Indikator für das Absterben von Salmonellen in Flüssigmist (MÜNCH et al. 1987); dagegen ist *E. coli* ungeeignet für die Beurteilung von Käse im Hinblick auf eine fäkale Kontamination, da dieser Keim sich in Käsereianlagen vermehren kann (BUSSE 1985).

Für die Bewertung einer keimvermindernden Maßnahme ist eine Resistenz für eine möglichst große Anzahl obligat und fakultativ pathogener Keime zu fordern (METHLING und MEHLHORN 1985).

2.3.1 *Enterobacteriaceae*

Die Familie *Enterobacteriaceae* umfasst gramnegative, aerobe oder fakultativ anaerobe Stäbchen. Folgende Gattungen werden der Familie zugeordnet (EUZÉBY 2001; ROLLE und MAYR 2001):

I <i>Escherichia</i>	VII <i>Enterobacter</i>
II <i>Edwardsiella</i>	VIII <i>Hafnia</i>
III <i>Citrobacter</i>	IX <i>Serratia</i>
IV <i>Salmonella</i>	X <i>Proteus</i>
V <i>Shigella</i>	XI <i>Yersinia</i>
VI <i>Klebsiella</i>	XII <i>Erwinia</i>

Innerhalb der *Enterobacteriaceae* lassen sich als Kommensalen lebende, nur fakultativ pathogene Keime sowie Krankheitserreger unterscheiden, die teils lebensbedrohliche Erkrankungen mit seuchenhaftem Verlauf auslösen. Zur ersten Gruppe gehören beispielsweise Vertreter der Gattungen *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* und *Yersinia*, während *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* sowie *Yersinia enterocolitica* der zweiten Gruppe zugerechnet werden (BRENNER 1974).

Alle *Enterobacteriaceae* wachsen gut auf gewöhnlichen Nährböden, bauen Kohlenhydrate auf fermentativem Wege ab, reduzieren Nitrate zu Nitriten und reagieren Oxidase-negativ (ROLLE und MAYR 2001). Die Differenzierung der einzelnen Gattungen erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen biochemischen und physiologischen Eigenschaften (ULLMANN 1982; WUNDT 1984). Da *Enterobacteriaceae* sich durch ihre Körper- (O-), Geißel- (H-) und Kapsel- (Vi-, K-) Antigene voneinander unterscheiden, kann innerhalb der Gattungen bzw. einer

Art mit Hilfe einer serologischen Typisierung eine genaue Identifizierung vorgenommen werden (ROLLE und MAYR 2001; ULLMANN 1982; WUNDT 1984).

Enterobacteriaceae werden als Indikatorkeime für hygienische Beurteilungen genutzt, da alle fakultativ oder obligat pathogenen Fäkalbakterien, die als Zoonoseerreger in Frage kommen, zu dieser Familie gehören (BREER et al. 1979).

2.3.2 *E.coli* /koliforme Keime

„Koliforme Keime“ ist ein Begriff aus der angewandten Bakteriologie und wird für jene *Enterobacteriaceae* verwendet, die – wie *E. coli* – bei 37°C Laktose-positiv reagieren: Es handelt sich um die Gattungen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Citrobacter*. *E. coli* wird als spezifischer Fäkalindikator angesehen, da diese Spezies fast ausschließlich im Darm lebt (BUSSE 1985). Wenn der spezifische Nachweis von *E. coli* als zu aufwändig erscheint, wird der leichter durchführbare Koliformen-Nachweis gewählt, obwohl die meisten Vertreter dieser Gruppe keine spezifischen Fäkalindikatoren sind. Sie sind aber gut geeignet, um die Effektivität einer prophylaktischen thermischen Desinfektion oder anderer Desinfektionsmaßnahmen zu überprüfen (WIEDENMANN et al. 1988).

E. coli wird als hochpotenter Fäkal-Indikator angesehen und u. a. routinemäßig zur Trinkwasserprüfung verwendet; beispielsweise dürfen laut Trinkwasser-Verordnung in 100 ml Trinkwasser keine *E. coli* nachweisbar sein (BUSSE 1985).

2.3.3 Fäkalstreptokokken / Enterokokken

Auch der Begriff „Fäkalstreptokokken“ entstammt der angewandten Mikrobiologie und wird für Enterokokken sowie für die serologische Gruppe der D-Streptokokken verwendet. Im Einzelnen umfassen Fäkalstreptokokken u. a. die Spezies *Enterococcus* (Ent.) *faecalis* var. *faecalis*, *Ent. faecalis* var. *liquefaciens*, *Ent. faecalis* var. *zymogenes*, *Ent. faecium*, *Ent. durans* sowie *Streptococcus* (Sc.) *equinus* und *Sc. bovis* (ROLLE und MAYR 2001). Aus menschlichem Material wird vor-

wiegend *Ent. faecalis*, aus Abwasser mehr *Ent. faecium* und *Ent. durans* isoliert (ROLLE und MAYR 2001).

Da Fäkalstreptokokken gegenüber Umwelteinflüssen außerordentlich resistent sind, werden sie zur Überprüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren bestimmt (GOLDSTEIN et al. 1988; METZGER 1994; MOSSEL 1982). Mit Ausnahme von *Sc. faecalis*, der fakultativ Endokarditiden und Harnwegsinfektionen hervorrufen kann, spielen Fäkalstreptokokken als Krankheitserreger eine untergeordnete Rolle (BISPING 1988).

2.3.4 Salmonellen

Die Gattung *Salmonella* umfasst gramnegative, fakultativ anaerobe, peritrich begeißelte (Ausnahme: *S. Gallinarum pullorum*) Stäbchen, die sich nach ihrer Antigenformel – dem sogenannten KAUFFMANN-WHITE-Schema in über 2000 Serotypen unterteilen lassen (BISPING 1988). Zur weiteren Subklassifizierung ist eine Phagentypisierung möglich. Hierbei werden die Isolate aufgrund ihres phänotypisch auswertbaren Lysebildes gegenüber sogenannten Typhakteriophagen ausgewertet. Bezüglich der Nomenklatur wird die Nummer des Phagentyps (PT) – häufiger „DT“ als Abkürzung für „definitive type“ – an den Sero-var-Namen angehängt (SCHROETER et al. 1991; WARD et al. 1987).

Zur Gattung *Salmonella* gehören die Erreger des Typhus abdominalis, des Paratyphus A, B und C und eine große Anzahl von Enteritiserregern, die sowohl für den Menschen als auch für Tiere pathogen sind, sowie Erreger von tierartspezifischen Salmonellosen (ROLLE und MAYR 2001). Zu den letztgenannten Salmonellen zählen beispielsweise *S. Dublin* als Erreger der Rindersalmonellose oder *S. Gallinarum pullorum* als Erreger der Kükenruhr, *S. Abortus equi, bovis, ovis* als Abortverursacher bei Pferden, Rindern und Schafen oder *S. Typhimurium var. copenhagen* als Erreger der Taubensalmonellose (ROLLE und MAYR 2001).

Beim Menschen führen Infektionen mit Salmonellen zu Enteritiden bzw. Lebensmittelinfektionen. Infektionen durch Enteritis-Salmonellen sind – besonders bei Erwachsenen – die häufigste erfasste Ursache von Durchfallerkrankun-

gen und werden überwiegend durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Eier, Fleisch, Wurst) ausgelöst. Direkte Übertragungen von Mensch zu Mensch spielen bei den Enteritis-Salmonellen nur eine untergeordnete Rolle (Robert-Koch-Institut 1998). In der Nahrungskette nimmt der Salmonelleneintrag über folgende Glieder kontinuierlich ab: Urproduktion → Gewinnung und Verarbeitung → Handel, Transport, Lagerung → Verbraucher. Daher kommt der Hygienesicherung in der gesamten Erzeugerkette große Bedeutung zu (FEHLHABER 2002).

Der zunehmende Infektionsdruck der Haus- und Nutztierbestände auf den Menschen verändert auch den Salmonellenstatus der Umwelt (KÖHLER 1993). Ausgehend von tierischen Ausscheidungen über belebte Vektoren, wirtschaftseigenes Futter oder durch Verschleppung in das Grundwasser können sich verschiedene epidemiologische Kreisläufe schließen, in die die landwirtschaftlichen Nutztiere und/oder der Mensch eingebunden sind (BÖHM 1993). Beispielsweise wurden in 36% frischer Bioabfall-Proben Salmonellen der Serotypen *Enteritidis*, *Infantis* oder *Agona* detektiert. Auch wenn nach der Kompostierung dieser Bioabfälle keine Salmonellen im Endprodukt nachweisbar waren, fielen Untersuchungen des Sickerwassers aus den Kompostierbehältern bis zum Ende des Verrottungsprozesses *Salmonella*-positiv aus. Im Laborversuch überlebten die Salmonellen in Sickerwasser bei 5°C bis zu 42 Tagen, d.h. dass das Sickerwasser ein Reservoir für das Überleben von Salmonellen aus Bioabfällen und eine permanente Kontaminationsquelle für die Umwelt darstellt (KNOP et al. 1996).

Das epidemische Geschehen in einem Land wird stets überwiegend von einzelnen, meist nur von einem Stamm bestimmt, der nach einer gewissen Zeit seinen Platz einem neuen Epidemiekolon räumt und wieder aus der Erregerlandschaft verschwindet (KÜHN und TSCHÄPE 1995). So war der *S. Enteritica*-Stamm PT4 der Serovar *Enteritidis* über Jahre hinweg in der „Salmonella-Landschaft“ unbekannt, avancierte zwischen 1984 und 1986 zum dominierenden Epidemietyp und befindet sich seit 1992 wieder auf dem Rückzug (LIESEGANG et al. 1997). Das Vorkommen der Serovar *Enteritidis* ist rückläufig, sie stellt aber mit einem Anteil von rund 55% nach wie vor den vorherrschenden Erreger von Erkrankungen beim Menschen dar. Erkrankungen durch die Serovar *Typhimurium*,

den zweithäufigsten Erreger einer Salmonellose beim Menschen, haben in den letzten Jahren aufgrund des Rückgangs von *S. Enteritidis* bereits relativ zugenommen und erreichten 1997 einen Anteil von 29% (Robert-Koch-Institut 1998).

Ein bestimmter multiresistenter Lysotyp von *S. Typhimurium* – DT104 – breitet sich in verschiedenen europäischen Ländern, vor allem in Großbritannien, aber auch in Deutschland bei Rindern und neuerdings beim Geflügel aus und stellt damit auch für den Menschen eine zunehmende Gefahr dar (Robert-Koch-Institut 1998). Mit einer Häufung des Vorkommens beim Rind und schließlich beim Schwein unterscheidet sich *S. Typhimurium* DT104 deutlich von *S. Enteritidis* PT4, für die als Reservoir das Huhn und das Ei anzusehen sind (LIESEGANG et al. 1997).

S. Typhimurium DT104 wurde erstmalig 1984 in Großbritannien isoliert und hat dort inzwischen nach dem *S. Enteritidis*-Phagentyp 4 die höchste Prävalenz beim Menschen (THRENLFAL et al. 1996). Kontakt mit kranken landwirtschaftlichen Nutztieren und der Verzehr von Geflügel-, Schweine- und Rindfleisch wurden in England und Wales als Risikofaktoren für eine Infektion mit *S. Typhimurium* DT104 identifiziert (WALL et al. 1994). Die Sero var wurde aus Probenmaterial verschiedener Spezies isoliert: Geflügel, Schaf, Schwein (ANON. 1993), Katze, Wildvögeln, Nager, Füchse und Dachse (EVANS und DAVIES 1996), Pferd, Ziege, Emu, Hund, Elch, Kojote, Waschbär, Nerz (BESSER et al. 1997).

Das Pathogenitätsprinzip von *S. Typhimurium* DT104 besteht aus einer Reihe von Faktoren, die teilweise in ihrer Bedeutung noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Robert-Koch-Institut 1999). Hierzu gehören das Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Zellmembran mit dem O-Antigen und dem als Endotoxin wirkenden Lipoid A, ein Enterotoxin mit Adenosindiphosphat-Ribosyltransferaseaktivität (CHOPRA et al. 1987), ein Cytolysin mit hemmender Wirkung auf die Proteinsynthese (KOO et al. 1984) und eine Reihe plasmidkodierter Faktoren, die vermutlich an der Serumresistenz beteiligt sind (HACKETT et al. 1987; VANDENBOSCH et al. 1987). Das Ausschalten einzelner Faktoren des Pathogenitätsprinzips wie beispielsweise das des vollständigen O-Antigens der Zellwand führt in der Regel zu einer starken Verminde-

rung oder sogar zum vollständigen Verlust der Virulenz der Bakterien (GROISMAN et al. 1990).

2.3.4.1 Humanmedizinische Bedeutung

Die durch Salmonellen verursachten Erkrankungen des Menschen stehen in Deutschland quantitativ gesehen mit weitem Abstand an der Spitze der gemeldeten lebensmittelbedingten Infektionen. Neben dem Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln kann eine Salmonellose beim Menschen durch direkten Tierkontakt sowie durch kontaminiertes Abwasser oder Oberflächenwasser hervorgerufen werden (ROLLE und MAYR 2001). Dabei wird vermutet, dass die 30.000 bis 40.000 zur Zeit jährlich gemeldeten Erkrankungsfälle nur 10 bis 20% der tatsächlich vorkommenden Krankheitsfälle ausmachen (MEYER 1999). Der Mensch infiziert sich mit Salmonellen hauptsächlich durch den Verzehr infizierter bzw. kontaminierter Lebensmittel tierischer Herkunft (GROßKLAUS 1993).

Bei einer vergleichenden Auswertung der 1997 nach dem Bundesseuchengesetz gemeldeten Salmonellosen, der Fälle eines ausgewählten Sentinel-Labors und derjenigen des Nationalen Referenzzentrums zeigte sich für alle drei Datenquellen ein deutlicher Gipfel der Salmonellose in den Sommermonaten und im Frühherbst und ein insgesamt fast übereinstimmender Verlauf. Übereinstimmend zeigten sich zwischen Juli und September etwa 40% aller Salmonellosen. In diesem Zeitraum lagen die monatlichen Inzidenzraten bei 20 bis 30/100.000 Einwohnern (GERICKE et al. 1999). Etwa ein Viertel der Salmonellosen entfielen auf das Säuglings-, Kleinkind- und Vorschulalter, die knappe Hälfte auf die Altersklassen bis 14 Jahre (GERICKE et al. 1999).

Im Jahr 1994 wurde eine Übertragbarkeit von *S. Typhimurium* DT104 von Rindern und Schafen auf den Menschen nachgewiesen (FONE und BARKER 1994) und bereits zwei Jahre später über das Vorkommen in 29 Staaten der USA berichtet (HOSEK et al. 1997).

Beim Menschen wurden Gastroenteritiden mit gesicherter *S. Typhimurium* DT104-Ätiologie in England, Schottland und Irland (CALVERT et al. 1998; DA-

VIES et al. 1996; FONE und BARKER 1994; GREIN et al. 1999), in den USA (FRIEDMAN 1998) und in Deutschland (GERICKE et al. 1999) nachgewiesen.

Die Inzidenz für eine *S. Typhimurium* DT104-Salmonellose wird für Schottland mit 10,1-13 Fällen pro 100.000 Einwohnern angegeben. Bei 37,8% der Betroffenen bestand ein regelmäßiger Kontakt zu Tieren und bei 36,3% der Erkrankten handelte es sich um Kinder unter 6 Jahren (CALVERT et al. 1998).

Klinisch zeigt sich die Salmonellose des Menschen als Enterocolitis, die zwischen acht und 72 Stunden nach Kontakt mit dem infektiösen Material auftritt (D'AOUST 1997). Die Erkrankung verläuft normalerweise selbstlimitierend und eine Remission der charakteristischen, nicht-blutigen Diarrhoe und abdominalen Schmerzen ereignet sich innerhalb von fünf Tagen nach Einsetzen der Symptome (MENG und DOYLE 1998). Die Symptome einer *S. Typhimurium* DT104-Infektion sind ernster und resultieren in einer höheren Mortalität (3,0%) verglichen mit anderen Salmonellen (0,1%) (HOSEK et al. 1997). Die Antibiotikaresistenz von *S. Typhimurium* DT104 dürfte in der Regel für die Therapie der Salmonellose des Menschen nicht von allzu großer Bedeutung sein, da als klinisches Hauptbild der Salmonellose des Menschen der Durchfall dominiert und somit eine Antibiotikatherapie nicht angezeigt ist (LIESEGANG et al. 1997). Da die Erkrankung bei Kindern und Senioren jedoch auch septikämische Krankheitsbilder annimmt, kann die Kenntnis vorhandener Antibiotikaresistenzen von lebenserhaltender Bedeutung sein, so dass eine kontinuierliche Überwachung erforderlich ist (LIESEGANG et al. 1997).

2.3.4.2 Veterinärmedizinische Bedeutung

Das Tier kann sich über verschiedene Wege mit Salmonellen infizieren. Die wichtigsten Infektketten, die den Kreislauf der Salmonellen bei Mensch und Tier unterhalten, sind: Tier → Tier, Futtermittel → Tier → (Lebensmittel →) Mensch, Tier → Mensch, Mensch → Tier und Milieu/Geräte → Lebensmittel → Mensch (ROLLE und MAYR 2001).

Ein wesentlicher Grund für die Aufrechterhaltung des „Infektionskreislaufes“ zwischen Mensch, Tier und Umwelt ist die Infektion der Tiere durch die mit

Salmonellen kontaminierten Futtermittel. Die Kontamination der Umwelt spielt beim Salmonellengeschehen eine herausragende Rolle. Epidemiologische Untersuchungen verdeutlichen die große Bedeutung der tierischen Fäkalien wie Dung und Gülle bei der Verbreitung der Salmonellen. Beispielsweise waren bei diagnostischen Untersuchungen in tierärztlichen Instituten in den alten Bundesländern 3,89% der untersuchten Rinderkotproben, 23,45% der Proben aus dem Abwasser und -schlamm, 14,29% der Düngemittelproben tierischer und 12,57% pflanzlicher Herkunft sowie 16,38% der Bodenproben Salmonella positiv (GROßKLAUS 1993). In Sammelbehältern von Güllegemeinschaftsanlagen waren native Salmonellen vereinzelt noch nach 149 und 185 Tagen Lagerung nachweisbar (RAPP 1995).

Bei Rindern ist *S. Typhimurium* DT104 mittlerweile die am häufigsten nachgewiesene Salmonellen-Serovar (FONE und BARKER 1994). Sie verursacht bei Rindern wässrige bis blutige Durchfälle, einen Rückgang der Milchproduktion, Pyrexie, Anorexie, Dehydratation und Leistungsminderung. Gelegentlich verläuft die Erkrankung als Septikämie oder fibronekrotische Enterocolitis. Ein Häufigkeitsgipfel ist während der Abkalbesaison zu beobachten (POPPE et al. 1998). Bei Kälbern tritt eine Salmonellose besonders häufig zwischen der zweiten und sechsten Lebenswoche auf und zeigt sich entweder in einem milden oder einem bösartigen Verlauf, wobei Übergangsformen möglich sind. Die Symptome eines bösartigen Verlaufes sind hohes Fieber, breiige Durchfälle mit Beimengungen von Blut oder Fibrin, Inappetenz und schnell einsetzende Hinfälligkeit. Der Tod tritt innerhalb von ein bis zwei Tagen unter septikämischen Erscheinungen oder innerhalb von 6-10 Tagen unter allmählicher Verschlimmerung ein. Die milde Verlaufsform äußert sich lediglich in nachlassender Munterkeit, herabgesetzter Fresslust und mäßiger Temperaturerhöhung (SCHOONDERWOERD et al. 1988).

Auch bei erwachsenen Rindern treten die beschriebenen Verlaufsformen auf. Es kommen aber auch wochenlang andauernde, chronische Erkrankungen vor, nach deren Überstehen unbehandelte und behandelte Tiere für längere Zeit, u.U. lebenslang, Dauerausscheider bleiben (EVANS und DAVIES 1996).

Aus Großbritannien wurden Mortalitätsraten bis zu 60% in von Salmonellose betroffenen Rinderbeständen berichtet (HOGUE et al. 1997). In Schottland

wurden Mitte der 1990er Jahre 15 von 16 Rinder-Salmonellosen durch *S. Typhimurium* DT104 ausgelöst (LOW et al. 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass Infektionen des Rindes in der Frühgravidität zur Geburt lebender Kälber mit zentralnervösen Ausfallerscheinungen führen können (PENNY et al. 1996)

Beim Schwein dominiert als Erreger der nicht tierartspezifischen Salmonellosen *S. Typhimurium* in Europa bei weitem und stellt etwa 80% aller Isolate vom gesunden Schlachtschwein. Der Phagentyp DT104 macht bei steigender Tendenz bereits um die 40-50% aller *Typhimurium* -Isolate aus. Eine *S. Typhimurium* - Infektion verläuft beim Schwein in der Regel latent und diese Serovar ist kein primärer Krankheitserreger bei dieser Tierart (BLAHA 1999). Dennoch wird gelegentlich auch von klinischen Salmonellosen berichtet, die besonders bei Mastschweinen zu hohen Verlusten führen können (PEREZ et al. 1999; SCHWARTZ 1991). Da Schweinefleisch eine zunehmende Bedeutung als Quelle für die menschliche Salmonellose gewinnt, wurde mit Unterstützung der Kommission der Europäischen Gemeinschaft in sechs EU-Ländern die internationale Studie „Salmonella in pork (Salinpork)“ initiiert. Das Projekt beinhaltet epidemiologische und diagnostische Aspekte und hat zum Ziel, durch Eingrenzung möglicher Risikofaktoren eine Übertragung der Salmonellen auf den Menschen so weit wie möglich zu verhindern (ALTROCK 2001). Dies ist von besonderer Bedeutung, da auch aus schweinehaltenden Betrieben mit einer geringen Seroprävalenz Salmonellen-kontaminiertes Fleisch stammen kann (LUDEWIG et al. 2001).

2.3.4.3 Antibiotikaresistenz

S. Typhimurium DT104 zeigt Resistenz gegenüber zahlreichen Antibiotika, besonders gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamiden und Tetrazyklinen (GERICKE et al. 1999; HOSEK et al. 1997). Hierbei bestehen speziesbedingte Unterschiede. Von aus Fäkalmaterial isolierten *S. Typhimurium* zeigten beim Schwein 84,2% der Proben multiple Resistenzen, bei Geflügel waren es 71,4% und beim Menschen 26,7% (RHEAULT und QUESSY 2001). Die genetischen Grundlagen dieser Resistenzen wurden mittels PCR-Assays untersucht. Bis auf ein plasmidkodierte Tetrazyklin-Gen waren alle Resistenzgene

in der chromosomalen Desoxyribonukleinsäure (DNA) lokalisiert (FRECH und SCHWARZ 2000). Im Gegensatz hierzu wird aber auch angenommen, dass das Plasmid die resistenzvermittelnden Gene kodiert und dass anschließend mobile DNA-Elemente – sogenannte Integrone – entstehen, die in die Chromosomen aufgenommen werden (BRIGGS und FRATAMICO 1999; KIM et al. 2001).

Bei der systematischen Analyse von über 2000 *S. Typhimurium*-Isolaten von Mensch und Tier fanden sich 23 verschiedene Resistenzmuster, von denen eine kombinierte Resistenz gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Tetrazyklin, Streptomycin und Spectinomycin mit 69,5% (Mensch) und 64,8% (Tier) am häufigsten auftrat (CASIN et al. 1999).

Bisher traten nur vereinzelte Resistenzen gegen Ciprofloxacin (0,2%) und Cefotaxim (0,1%) auf (GERICKE et al. 1999). Eine wachsende Resistenz gegenüber β -Lactam-Abkömmlingen wird weltweit durch β -Lactamase-produzierende Salmonellen beobachtet (WASYL und HOSZOWSKI 2001; WINOKUR et al. 2000).

2.3.4.4 Bekämpfung der Salmonellose

Eine Bekämpfung der Salmonellose in Tierbeständen kann nur unter Einhaltung bestimmter Grundvoraussetzungen erfolgreich verlaufen (MEYER et al. 1993):

1. Gutes Management in Verbindung mit
2. konsequent durchgesetzten zoosanitären (veterinärhygienischen) Maßnahmen und
3. wirksamen zusätzlichen antiinfektiösen Maßnahmen, z. B. Immunprophylaxe.

Wichtig ist, dass alle drei Schritte zusammen erfolgen, d. h. dass weder Impfungen noch Management- und Hygienemaßnahmen allein zuverlässig wirksam sind und Impfungen zusätzlich und nicht anstelle der übrigen Handlungsweisen durchgeführt werden sollten (LUDWIG und CALSOW 1992).

Für die Immunprophylaxe sind in Deutschland die Impfstoffe Suisaloral® gegen *S. Choleraesuis* für das Schwein, Bovisaloral® gegen *S. Dublin* bzw. *Enteritidis* beim Kalb, Zoosaloral R® gegen *S. Typhimurium* bzw. *Dublin* beim Kalb für die orale Anwendung und Salmovac® gegen *S. Dublin* beim Rind sowie Muri-vac® gegen *S. Typhimurium* bei Rind, Taube und Huhn zur subkutanen Applikation zugelassen (MEYER et al. 1993).

Bei Suisaloral®, Bovisaloral® und Zoosaloral® handelt es sich um Lebendimpfstoffe, denen doppelt attenuierte, auxotrophe Mutanten zugrundeliegen. Alle drei Impfstoffe wurden gründlich auf genetische Stabilität, selbstverständlich auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit, aber auch auf epidemiologische Unbedenklichkeit geprüft und sind aufgrund ihrer Auxotrophie problemlos von Salmonellen-Wildstämmen zu unterscheiden (MEYER et al. 1993). Als Vorteile der Lebendimpfstoffe gelten:

- Lebendimpfstoffe induzieren die Induktion humoraler Antikörper und zellvermittelter Immunreaktionen (PAUL et al. 1985).
- Durch die Möglichkeit der oralen Applikation wird der natürliche Infektionsweg imitiert und die lokalen Immunreaktionen des Darms bzw. der Darmlymphknoten können genutzt werden (STEINBACH et al. 1985).
- Die Ausbildung einer lokalen Immunität reduziert die Haftung und Vermehrung von Wildstämmen und behindert die Entstehung von Dauerausscheidern (BARROW et al. 1988).
- Lebendimpfstoffe wirken schneller und benötigen weniger Applikationen als inaktivierte Vakzine (PARDON et al. 1990).
- Lebendimpfstoffe bieten gute Voraussetzungen für die Entstehung einer Kreuzimmunität, beispielsweise Zoosaloral® neben dem homologen Schutz gegenüber *S. Typhimurium* auch gegen *S. Enteritidis* beim Geflügel und gegen *S. Dublin* beim Kalb (MEYER et al. 1993).

Da die für Lebendimpfstoffe eingesetzten Impfstämme voll gegenüber Antibiotika bzw. Chemotherapeutika sensibel sind, verbietet sich eine gleichzeitig mit der Gabe solcher Medikamente erfolgende Impfung (MEYER et al. 1993). Übereinstimmend weist JENS (1994) darauf hin, dass die bei der Neuaufstellung von Kälbern häufig durchgeführte „Einstellprophylaxe“ in Form von Antibiotikaapplikationen der Durchführung einer Salmonellen-Impfung im Wege stehen kann.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungen in einer Biogasanlage und der gülleliefernden Milchviehanlage I sowie der Milchviehanlage II in Oberlungwitz/Sachsen

3.1.1 Beschreibung der Biogasanlage und der gülleliefernden Milchviehanlage I, einschließlich Salmonellosestatus

Die untersuchte Biogasanlage in Oberlungwitz/Sachsen (Tabelle 3, Abbildung 4) arbeitet mesophil und wurde im September 1994 in Betrieb genommen. In der Biogasanlage werden in einem zweistufigen Prozess Rinderflüssigmist aus der daneben stehenden Milchviehanlage und Hühnerkot sowie Fettabscheiderinhalte fermentiert.

Der Gesamtviehbesatz der Milchviehanlage besteht aus ca. 800 Milchkühen, 60 Färsen (über zwei Jahre alt), 650 Tieren im Alter von einem halben bis zwei Jahren und 250 Kälbern unter einem halben Jahr alt.

Diese Rinder produzieren täglich 60-70 m³ Flüssigmist, der in ein Sammelbecken in der Milchviehanlage gelangt. Täglich erreichen zusätzlich 10 m³ Geflügelkot und ca. 2 bis 3 m³ Fettabscheiderinhalte den ersten Fermenter. Diese Inputstoffe werden 24 Stunden bei einer Temperatur von 55°C vorbehandelt und danach bei 70°C 1 Stunde pasteurisiert. Dabei erfolgt eine ständige Durchmischung des Materials.

Wochentags wird die Gülle zweimal täglich, am Wochenende einmal täglich, über ein Pumpsystem in den ersten Fermenter befördert. Gleichzeitig wird der zweite Fermenter mit Inhalt des ersten Fermenters aufgefüllt. Fermentierte Gülle gelangt zeitgleich in die Lagune (Abbildung 5).

Die mittlere Verweildauer des zu fermentierenden Substrates in beiden Fermentationsbehältern beträgt 24 Tage. Die vergorene Gülle wird auf insgesamt 943 ha Ackerland ausgebracht.

Tabelle 3: Parameter der Biogasanlage in Oberlungwitz/Sachsen

Anlagenparameter	
Parameter	Daten
Baujahr	1994
Art der Anlage	Zweistufige Durchflussanlage
Verfahren	Mesophiles Nassverfahren
Biogasreaktor	
Material	Beton, Dämmung aus Polystyrol
Volumen	2 x 1150 m ³
Gasspeicher	
Art	Doppelfoliengasspeicher
Volumen	800 m ³
Leistung des Bioheizkraftwerks	
Elektrisch	220 kW
Thermisch	350 kW
Verfahrensparameter	
Parameter	Daten
Hygienisierung	Hühnergülle/Fettscheiderabfälle 1 h bei 70°C
Temperatur	38°C
Verweilzeit	Max. 33 Tage
Methangehalt des Biogases:	62 %
Heizwert des Biogases	6,2 kWh/Nm ³
Input, Output, Energieanfall	
Parameter	Daten
Ausgangsstoffe	
Rindergülle	60-70 m ³ /Tag
Hühnergülle	10 m ³ /Tag
Fettscheiderinhalte	2-3m ³ /Tag
gemessener Biogasertrag	2174 m ³ / Tag
Endprodukt: fermentierte Gülle	
elektrische Energie	3883 kWh/Tag
Wärmeenergie	6062 kWh/Tag



Abbildung 4: Ansicht der Biogasanlage in Oberlungwitz/Sachsen

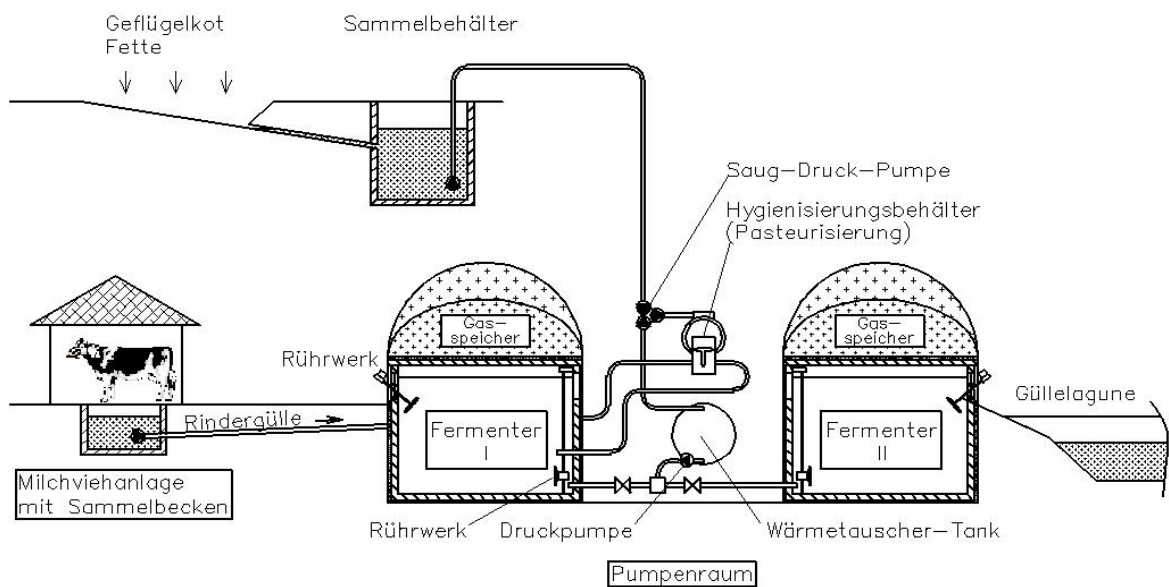


Abbildung 5: Durchflußschema zu der Biogasanlage in Oberlungwitz/Sachsen

Im August 1996 erkrankten Rinder und Kälber in der Milchviehanlage I an Salmonellose. Als Erreger wurde am 24.08.1996 *S. Typhimurium* durch das Landesuntersuchungsamt Chemnitz nachgewiesen. Daraufhin erfolgten vom 02.09.1996 bis einschließlich 07.01.1997 amtlich angeordnete mikrobiologische Untersuchungen auf Salmonellen aus 458 Koteinzelproben, 141 Kotsammelproben, 84 Umgebungstupfern sowie aus drei Futtermittelproben. Von diesen insgesamt 686 Proben konnte in 85 Fällen *S. Typhimurium* nachgewiesen werden.

Alle Ergebnisse der Kot-, Kotsammel- und Umgebungsuntersuchungen sind im einzelnen im zeitlichen Ablauf in Tabelle 4 veranschaulicht.

3.1.2 Charakterisierung der Milchviehanlage II in Oberlungwitz/Sachsen

In einer zweiten Milchviehanlage wurde Gülle zu vergleichenden Untersuchungen des bakteriellen Spektrums entnommen. Dieser Milchviehbetrieb befindet sich ebenfalls in Oberlungwitz/Sachsen, jedoch territorial getrennt von der Milchviehanlage I. In der Anlage II fällt Rinderflüssigmist von ca. 80 Milchkühen als Abprodukt an.

Tabelle 4: Vorberichtliche Ergebnisse amtlich angewiesener Kot-, Kotsammel- und Umgebungsuntersuchungen in der Milchviehanlage I nach einer am 24.08.1996 festgestellten Salmonellose, ausgelöst durch *S. Typhimurium*

Proben- entnahme- tag	Kot- proben	Kot- sammel- proben	Anzahl der untersuchten Proben		Serovar/ Stamm
			Umgebungs- proben=UP Futtermittel- proben=FP	Anzahl (Ort) der Salmo- nellen- nachweise	
02.09.96	99			39	<i>S. Typhimurium</i> - Feldstamm
		20		1	<i>S. Typhimurium</i> - Feldstamm
12.09.96			3 FP	0	
			20 UP	1 (Futtergabel)	<i>S. Typhimurium</i> - Feldstamm
10.10.96			20 UP	1 (Wandbereich der Repro- duktionsabteilung)	<i>S. Typhimurium</i> - Feldstamm
17.10.96			20 UP	1 (Wandbereich einer Tro- ckenbox)	<i>S. Typhimurium</i> - Impfstamm
29.10.96	104			21	<i>S. Typhimurium</i> - Impfstamm
				3	<i>S. Typhimurium</i> - Feldstamm
			24 UP	1	<i>S. Typhimurium</i> var. <i>copenhagen</i>
06.11.96	65			5	<i>S. Typhimurium</i> - Feldstamm
				3	<i>S. Typhimurium</i> var. <i>copenhagen</i>
12.11.96	33			0	
19.11.96	43			0	
22.11.96	22			3	<i>S. Typhimurium</i> - Feldstamm
26.11.96	42			0	
		17		1	<i>S. Typhimurium</i> - Feldstamm
03.12.96	50			0	
		16		0	
10.12.96		24		0	
17.12.96		17		1	<i>S. Typhimurium</i> - Feldstamm
07.01.97		47		4	<i>S. Typhimurium</i> - Impfstamm

3.1.3 Entnahme von Probenmaterial in den Milchviehanlagen I und II sowie der Biogasanlage

Die Entnahme der Gülle- und Fettabscheiderproben sowie der Proben der Fermentationsstufen erfolgten durch die Promovendin einen Tag vor oder am Tag des Beginns der Untersuchungen. Die Proben wurden mit sterilen Materialien entnommen und in Flaschen abgefüllt. Um eine repräsentative Probe zu erhalten, fand eine Durchmischung der unbehandelten Gülle und des Fettabscheiderinhaltes in deren Behältern durch eingebaute Rotoren statt. Ebenfalls konnte aus den Fermentern eine repräsentative Probenahme erfolgen, da die Fermenterinhalt regelmäßig gerührt werden. Lediglich der Inhalt der Lagune konnte vor den Probenahmen nicht durchmischt werden. Bis zum Beginn der Untersuchungen wurden die Proben in einem Kühlbehälter oder im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

3.1.4 Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der Gülle der Milchviehanlage I, der Fettabscheiderinhalte sowie des Fermentationsmaterials der angegliederten mesophilen anaeroben Biogasanlage

Die hygienisch-mikrobiologischen Untersuchungen, ausgeführt durch die Promovendin, umfassten den quantitativen Nachweis von Salmonellen mit dem KOCH'schen Plattenverfahren (s. Kap. 3.5.3) und dem MPN-Verfahren (s. Kap. 3.5.4) sowie den qualitativen Nachweis der isolierten Salmonellen (s. Kap. 3.5.5). Desweiteren wurden von jeder Probe der pH-Wert (s. Kap. 3.6) und der Trockensubstanzgehalt (TS) bestimmt (s. Kap. 3.7).

Im Verlauf des Jahres 1997 wurde an den vier unterschiedlichen Entnahmestellen (1. Gülle der Milchviehanlage I, 2. Fettabscheiderinhalte, 3. das Fermentationsprodukt nach dem Durchlaufen der Biogasanlage, 4. Lagune der fermentierten Gülle) neunmal Probenmaterial entnommen und quantitativ und qualitativ auf Salmonellen untersucht. Ein fragliches Isolat wurde aus der siebten Probe des Fettabscheiderinhalts im Robert-Koch-Institut Wernigerode typisiert. Die Serovare der übrigen Isolate wurden durch die Promovendin im Labor des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen in Leipzig und ergän-

zend in den auf S. 53 näher bezeichneten Fällen durch die Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen in Leipzig, bzw. das Robert-Koch-Institut, Bereich Wernigerode, bestimmt.

In den Monaten Februar und März des Jahres 1998 erfolgten insgesamt fünf Probenahmen an vier unterschiedlichen Orten (1. Gülle der Milchviehanlage I, 2./3. Fermentationsmaterial des ersten und zweiten Fermenters, 4. fermentierte Gülle in der Lagune) und die quantitative und qualitative Untersuchung auf Salmonellen. Die *Salmonella Typhimurium*-Isolate wurden typisiert.

Im Jahr 1999 wurden an adäquaten Entnahmestellen wie 1998 sieben Probenahmen durchgeführt. Neben dem quantitativen und qualitativen Salmonellennachweis erfolgte die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl, der Anzahl der *Enterobacteriaceae*, *E. coli* und der Enterokokken (s. Kap. 3.5.8 und 3.5.9). Die letzte Probennahme fand am 17.01.2000 statt und schloß eine Salmonellenuntersuchung der Fettabscheiderinhalte ein. Die isolierten Salmonellen wurden feintypisiert.

Insgesamt wurden in den vier Untersuchungsjahren 22 Durchgänge mit 87 Einzelprobenentnahmen bzw. -untersuchungen durchgeführt: anfallende Gülle der Milchviehanlage I (n = 22), Fermenter I (n = 13) und II (n = 20), Lagune (n = 22), Fettabscheiderinhalte (n = 10).

3.2 Untersuchungen zur Ermittlung der Überlebenszeiten von *S. Typhimurium* DT104 unter verschiedenen Laborbedingungen

3.2.1 Orientierende Untersuchungen zu Überlebenszeiten nativer Salmonellen im Rinderflüssigmist

Um die Überlebensdauer nativer Salmonellen in der Gülle zu untersuchen, wurde Gülle, wie in Kap. 3.1.3 beschrieben, entnommen. Je 100 ml dieser Gülle wurden in 300 ml-Flaschen gefüllt und mit einem Gummistopfen fest verschlossen. Anaerobe Verhältnisse wurde durch Stickstoff-Begasung des Luft- raumes in den Flaschen über der Gülle hergestellt. Entstehendes Gas konnte permanent durch eine Einmalkanüle im Gummistopfen entweichen. Die Fla-

schen wurden zweimal täglich kurz geschüttelt und die Proben im Wasserbad (Medingen W12) bei 35°C gelagert. Entsprechende Kontrollproben wurden im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt. Die Quantifizierung der Salmonellen erfolgte mit dem MPN-Verfahren (s. Kap. 3.5.4) bei 35°C am Versuchsbeginn, vier Stunden sowie ein, zwei, drei, vier und fünf Tage nach Inkubation der Gülle. Die Untersuchung der Kontrollprobe erfolgte quantitativ zu Beginn der Inkubation und nach zwei und vier Tagen.

3.2.2 Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 in Rinderflüssigmist der Milchviehanlage I, in Substrat der Lagune und in Rinderflüssigmist der Milchviehanlage II bei 7°C und 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)

Für die vergleichende Untersuchung der o.g. Gülle wurden 950 ml Material in Ein-Liter-Glasflaschen eingefüllt und mit 50 ml Salmonellensuspension (s. Kap. 3.5.2.1) vermischt. Entstehendes Gas konnte über eine Kanüle im Stopfen des Schraubverschlusses entweichen. In den Probenansätzen wurden der pH-Wert, der TS-Gehalt, die Anzahl der Salmonellen, die Gesamtkeimzahl sowie die Anzahl von *E. coli* und Enterokokken bestimmt. Die Proben wurden im wöchentlichen Abstand vom Versuchsbeginn jeweils im Doppelansatz untersucht.

3.2.3 Untersuchungen zum Überleben von *S. Typhimurium* DT104 in der Gülle der Milchviehanlage I, im Substrat des ersten und zweiten Fermenters und im Material der Lagune bei 37°C

Diese Untersuchung soll vergleichend Ergebnisse zum Überleben von *S. Typhimurium* DT104 in den verschiedenen Phasen der Fermentation bei 37°C liefern.

Es wurden 100 ml Gülle bzw. Fermentationsmaterial der unterschiedlichen Abbaustufen in 300 ml-Glasflaschen gefüllt, mit 1 ml Salmonellensuspension (s. Kap. 3.5.2.1) kontaminiert und bei 37°C gelagert. Entstehende Gase konnten durch eine großlumige Kanüle, die in den Gummistopfen des Schraubver-

schlusses gebracht wurde, entweichen. Die Probenahme erfolgte am Beginn der Untersuchung, nach sechs, zwölf und 24 Stunden sowie nach zwei, drei, vier und fünf Tagen. Zur quantitativen Bestimmung der Salmonellenanzahl wurde das MPN-Verfahren (s. Kap. 3.5.4) mit einer Nachweisgrenze von 0,4 KBE/ml genutzt. Der Versuch wurde mit demselben Material zur Absicherung der Ergebnisse zweimal wiederholt.

3.2.4 Untersuchungen zur Tenazität von *S. Typhimurium* DT104 in der flüssigen Phase (Ultrazentrifugation) der Gülle der Milchviehanlage I, der Substrate des ersten und zweiten Fermenters und der Lagune bei 37°C

Die Proben der verschiedenen Güllestadien (Gülle der Milchviehanlage I, Substrate der Fermenter I und Fermenter II, fermentierte Gülle der Lagune) wurden mit 17 000 U/min 30 Minuten in einer gekühlten Zentrifuge vorzentrifugiert und anschließend mit 100000 U/min 60 Minuten bei 4°C ultrazentrifugiert.

Von der flüssigen Phase des Zentrifugates wurden je 10 ml in lichtundurchlässige, sterile, dicht schließende und mit Gummistopfen versehene Glasröhrchen eingefüllt. Dieser Überstand der Ultrazentrifugation wurde vorher mit Einwegspritzen, ausgerüstet mit bakteriendichten Filtern (Minisart NML; Fa. Sartorius) filtriert und anschließend wurde zu dieser Gülleflüssigkeit je 0,1 ml *S. Typhimurium*-Testkeimsuspension (s. Kap. 3.5.2.1) hinzugegeben.

Die Lagerung der zu untersuchenden Proben geschah bei 37°C im Brutschrank.

Die Probenentnahme erfolgte sofort, sechs, zwölf und 24 Stunden sowie zwei, drei, vier und fünf Tage nach der Lagerung im Brutschrank. Nach der Desinfektion des Gummistopfens wurde mit Einwegmaterial je 0,5 ml des Untersuchungsmaterials entnommen und in 4,5 ml sterile Ringerlösung verbracht. Geeignete Verdünnungsstufen wurde im KOCH'schen Oberflächenverfahren einer Keimzahlbestimmung unterzogen. Diese Versuche wurden zweimal wiederholt.

3.2.5 Untersuchungen zum Überleben von *S. Typhimurium* DT104 in geschlossenen Ampullen im Rinderflüssigmist bei 37°C

Für diese Untersuchungen wurden Keimsuspension hergestellt (s. Kap. 3.5.2.1) und je 2 ml davon in 4 ml-Polypropylenampullen eingefüllt. Die Ampullen wurden fest verschlossen, in ein Gefäß mit Rindergülle verbracht und bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Die Keimzahlermittlung der Salmonellensuspension in den Ampullen erfolgte nach dem KOCH'schen Oberflächenverfahren bis zur 15. Woche einmal wöchentlich, danach alle zwei Wochen. Der Versuch wurde bis zur 65. Woche nach Versuchsbeginn insgesamt dreimal durchgeführt.

3.2.6 Untersuchungen zur Inaktivierung von *S. Typhimurium* DT104 nach dem Zusatz verschiedener organischer Säuren

SCHEUER (1986) hat den Gehalt an organischen Säuren während der anaeroben mesophilen Fermentation in Hühnerflüssigmist ermittelt (Tabelle 5). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Auftrag der Promovendin durch die Firma Biotechnologie und Analytik GbR, Leipzig, aus einer Probe des Fermenters I der Gehalt des fermentierenden Gemisches aus Rindergülle, Geflügelskot und Fettabscheiderinhalten an Essig-, Isobutter-, Butter- und Propionsäure ermittelt. Aus technischen Gründen war eine Bestimmung der Isovalerian- und Valeriansäure nicht möglich, statt dessen wurde zusätzlich das Vorkommen von Ameisensäure und Milchsäure analysiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Gehalt an organischen Säuren (mg/l) während der anaeroben mesophilen Fermentation in Hühnerflüssigmist (SCHEURER 1986) und dem Substrat des I. Fermenters (Rindergülle + Cosubstrate) in Oberlungwitz

Säure	SCHEURER (1986) Hühnerflüssigmist Temp. 32°C	Fermenter I in Oberlungwitz 1998 (Rindergülle + Geflügelkot + Fettabscheiderinhalte) 38°C pH 7,2; TS: 7,1%
Ameisensäure	nicht ermittelt	< 10
Essigsäure	21 324	20 000
Isobuttersäure	1 808	1 400
Buttersäure	2 783	4 600
Propionsäure	9 741	9 500
Isovaleriansäure	2 646	nicht ermittelt
Valeriansäure	902	nicht ermittelt
Milchsäure	nicht ermittelt	3 200

3.2.6.1 Materialien

Für die Untersuchungen zum Absterbeverhalten von *S. Typhimurium* nach dem Zusatz verschiedener organischer Säuren wurden folgende Chemikalien verwendet:

Tabelle 6: Aufstellung der in den Versuchen zur Inaktivierung von *S. Typhimurium* DT104 benutzten Chemikalien

Lfd. Nr.	Name	Artikelnummer	Hersteller
1	Ameisensäure	100264	Fa. Merck, Darmstadt
2	Essigsäure	100063	Fa. Merck, Darmstadt
3	Propionsäure	800605	Fa. Merck, Darmstadt
4	Buttersäure	800457	Fa. Merck, Darmstadt
5	Isobuttersäure	800472	Fa. Merck, Darmstadt
6	Valeriansäure	800821	Fa. Merck, Darmstadt
7	Isovaleriansäure	800820	Fa. Merck, Darmstadt
8	Milchsäure	100366	Fa. Merck, Darmstadt
9	Natronlauge 30 %	105589	Fa. Merck, Darmstadt

3.2.6.2 Prüfung einzelner Säuren zur Inaktivierung von *S. Typhimurium* DT104

Diese Methode diente der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) einzelner organischer Säuren gegen *S. Typhimurium* DT104. Der MHK-Wert ist gemäß DIN-Norm 58940 (Teil 4) die jeweils niedrigste Wirkstoffkonzentration, bei der unter definierten Bedingungen kein sichtbares Keimwachstum erfolgt. Von den zu testenden Säuren wurden Lösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt:

Tabelle 7: Getestete Konzentrationen organischer Säuren gegen *S. Typhimurium* DT104 (getestete Konzentrationen = x, nicht durchgeführt = n. d.)

	Konzentrationen							
	80g/l	40g/l	20g/l	10g/l	5g/l	2,5g/l	1,25g/l	0,625g/l
Ameisensäure	n.d.	n.d.	x	x	x	x	x	x
Essigsäure	x	x	x	x	x	x	x	n.d.
Propionsäure	n.d.	x	x	x	x	x	x	x
Buttersäure	x	x	x	x	x	x	x	x
Isobuttersäure	x	x	x	x	x	x	x	x
Valeriansäure	x	x	x	x	x	x	x	x
Isovaleriansäure	x	x	x	x	x	x	x	x
Milchsäure	x	x	x	x	x	x	x	n.d.

Die Chemikalienlösungen wurden mit verdünnter 30%-iger Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Zur Verdünnung der Lösungen verwendeten wir sterilisierte Ringerlösung. Die Röhrchen wurden mit 10 ml der verschiedenen Verdünnungstufen befüllt und mit 0,1 ml der Testkeimsuspensionen (s. Kap. 3.5.2.1) beimpft. Danach wurden die Lösungen bei 37°C aufbewahrt.

Als Kontrollen dienten sterile Ringerlösung als Negativkontrolle und 1%-ige Phenollösung zur Empfindlichkeitskontrolle der Teststämme.

Zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit von *S. Typhimurium* wurden nach zwei Stunden, ein, zwei, vier, sechs, acht, zehn, zwölf, 14, 16 und 18 Tagen

0,1 ml der Röhrcheninhalte nach leichtem Schütteln auf XLD-Agar pipettiert, mit sterilem Drigalskispatel ausgestrichen und das Wachstum nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C beurteilt.

3.2.6.3 Prüfung eines Gemisches organischer Säuren gegen *S. Typhimurium* DT104

Um das Absterbeverhalten von *S. Typhimurium* zu untersuchen, wurde eine Lösung aus Essig-, Isobutter-, Butter-, Propion- und Milchsäure hergestellt (Tabelle 8) und die Salmonella-Testkeimsuspension (s. Kap. 3.5.2.1) inokuliert.

Die Herkunft der verwendeten Säuren ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Da eine Chemikalienlösung zum Einsatz kommen sollte, die dem pH-Wert in der Biogasanlage ähnelt, erfolgte eine Einstellung auf den pH-Wert von 7,2.

Bei der Herstellung der Lösung musste beachtet werden, dass es nicht zur Erwärmung des Säure-Wassergemisches bei Zugabe von verdünnter 30%-iger Natronlauge und Ringerlösung kam. Um dies zu verhindern, wurden die Chemikalien in sterilen Bechergläsern im Wasserbad mit Eiszusatz vermischt. Weiterhin erfolgte eine Temperaturkontrolle mittels Thermometer, wobei die Temperatur der Chemikalienlösung 30°C nicht überschreiten durfte. Der benötigte pH-Wert wurde mit verdünnter 30%-iger Natronlauge eingestellt und anschließend mit steriler Ringerlösung auf die benötigte Menge aufgefüllt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Säuregemischs zur Prüfung der Inaktivierung von *S. Typhimurium* DT104

Säure	Konzentration (mg/l)
Ameisensäure	0
Essigsäure	20 000
Isobuttersäure	1 400
Buttersäure	4 600
Propionsäure	9 500
Milchsäure	3 200

3.3 Untersuchungen auf Auxotrophie verschiedener *S. Typhimurium*-Stämme

Sollen Bakterien als Lebendimpfstoff eingesetzt werden, müssen diese auxotrophe Mutanten sein. Sie sind auxotroph, wenn sie nur in Gegenwart bestimmter Wachstumsfaktoren (Aminosäuren, Vitamine, Purine) gedeihen, die der Wildstamm nicht benötigt. Damit kann unter anderem unterschieden werden, ob es sich bei isolierten Bakterien um einen Wildstamm oder einen attenuierten Impfstamm handelt.

Die Untersuchung der isolierten Impfstämme im Vergleich zum *S. Typhimurium* DT104-Wildstamm erfolgte mit Bovisaloral-Diagnostikum® (Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH) und auf MUELLER-HINTON-Agar (Fa. Merck).

Bovisaloral-Diagnostikum® ist ein teilergänzt, steriles Salmonellen-Minimalmedium zur Differenzierung der Zoosaloral®-Impfstämme von *S. Typhimurium*-Wildstämmen.

Das Bovisaloral-Diagnostikum® wurde mit einer geringen Menge Bakterienmaterial der zu untersuchenden *S. Typhimurium*-Stämme unter sterilen Bedingungen beimpft. Als Negativkontrolle diente ein unbeimpftes Behältnis mit Diagnostikum und als Positivkontrolle ein Behältnis, in das der *S. Typhimurium* DT104-Wildstamm eingebracht wurde. Es wurde darauf geachtet, dass die eingebrachte Menge Bakterienmaterial das Diagnostikum nicht sichtbar trübt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37°C bis zu 48 Stunden. Da der Impfstamm sich aufgrund des Fehlens essentieller Nährstoffe im Diagnostikum nicht vermehren kann, ist aus dem Ergebnis zu folgern, dass alle trüben, bewachsenen Behältnisse nicht mit dem Impfstamm, sondern mit dem *S. Typhimurium*-Wildstamm beimpft wurden.

Zur Untersuchung auf MUELLER-HINTON-Agar wurden zwei bis drei Kolonien der zu testenden *S. Typhimurium*-Stämme vom Standard-I-Nähragar in 5 ml steriler Ringerlösung eingerieben. Weiterhin wurden zwei bis drei Kolonien des *S. Typhimurium* DT104-Wildstammes in 5 ml Ringerlösung verbracht. Je 0,1 ml des zu untersuchenden Stammes und des Wildstammes wurden gemeinsam auf eine MUELLER-HINTON-Agarplatte pipettiert und mit Drigalski-

Spatel ausgestrichen. Zur sicheren Unterscheidung beider Stämme erfolgte zusätzlich die Ausspatelung von 0,1 ml des Ansatzes der zu untersuchenden Stämme und des Wildstammes auf zwei getrennte MUELLER-HINTON-Agarplatten. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Agarplatten bei 37°C wurden die Koloniegrößen der gewachsenen Stämme miteinander verglichen.

Der MUELLER-HINTON-Agar eignet sich zur Darstellung der unterschiedlichen Koloniegröße von Salmonella-Wildkolonien im Vergleich zu attenuierten Salmonella-Mutanten. Wildtypkolonien wachsen auf diesem Nährboden in normaler Größe. Im Vergleich bildet eine auxotrophe Defektmutante Kleinst- („pin-point“)-Kolonien.

3.4 Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit ausgewählter Salmonellenwildisolate und *S. Typhimurium*-Impfstämme

Die Bestimmung der Empfindlichkeit der Salmonellen gegen die zu prüfenden Chemotherapeutika erfolgte auf festem Kulturmedium im Agardiffusionstest. Das Prinzip des Testes besteht darin, dass der Wirkstoff gleichmäßig nach allen Seiten in den Nährboden hinein diffundiert und ein Konzentrationsgefälle bildet. Im Bereich hemmender Konzentrationen ist kein Wachstum von Mikroorganismen sichtbar.

Die Durchführung des Testes erfolgte nach der „Arbeitsempfehlung des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Berlin) zur Resistenzbestimmung schnell wachsender Bakterien in der Veterinärmedizin“ (ANON. 2000). Für Salmonellenwildstämme kam der nach DIN 58940 (Teil 3) empfohlene Spezialagar nach MUELLER-HINTON zur Anwendung. Die Salmonellen-Impfstämme wurden auf dem ISO-Sensi-Disc[®]-II-Agar[®] (Fa. Becton Dickinson) getestet.

Von den Salmonellenstämmen wurden drei bis fünf Einzelkolonien in 5 ml Nährbouillon eingimpft und bei 37°C ca. 90 Minuten lang bebrütet und danach mit einem sterilen Stopfen auf den Agar aufgebracht. Die hemmstoffhaltigen Testblättchen wurden mit dem Andruckdispenser (OXOID) appliziert. Der Andruckdispenser kann für acht hemmstoffhaltige Testblättchen gleichzeitig

genutzt werden. Bei dieser Verfahrensweise können sich die gebildeten Hemmhöfe stark überschneiden. Daher war es notwendig, nur vier Testblättchen je Dispenser auf einer Agarplatte gleichzeitig zu testen.

Nach einer halbstündigen Vordiffusion der Chemotherapeutika in das Nährmedium bei $20 \pm 2^\circ\text{C}$ und der Inkubation über 20 ± 2 Stunden bei 37°C wurden die entstandenen Hemmhöfe gemessen. Diese Hemmhofdurchmesser wurden entsprechend den Angaben der o.g. Arbeitsempfehlung für jeden einzelnen Wirkstoff den Bewertungsstufen sensibel, intermediär oder resistent zugeordnet (Tabelle 9).

Es wurden insgesamt 18 Wildstämme und 20 Impfstoff-Isolate von Salmonellen getestet.

Zur Beurteilung der Gültigkeit des Tagesansatzes wurde der *Staphylococcus aureus*-Stamm ATCC 25923 mitgeführt.

Tabelle 9: Getestete Antibiotika und Konzentration je Testblättchen, Bewertung der Hemmhofdurchmesser (mm)

Antibiotikum	Zeichen/ Konzentration pro Testblättchen	sensibel	intermediär	resistent
Amikacin	AK 30µg	20	14-19	13
Amoxicillin/Clavulan	AMC 20µg/10µg	28	21-27	20
Ampicillin	AMP 10µg	22	15-21	14
Cefuroxim	CXM30µg	18	15-17	14
Chloramphenicol	C 30µg	21	-	20
Enrofloxacin („Baytril®“)	ENR 5µg	22	18-22	17
Erythromycin	E 15µg	21	17-20	16
Gentamycin	CN 10µg	21	15-20	14
Neomycin	N 10µg	16	-	17
Penicillin G	P 10 IE	24	13-23	12
Spectinomycin	SH 10µg	12	-	13
Streptomycin	S 25µg	17	15-16	14
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	SXT 23,75µg/1,25µg	16	11-15	10
Sulfonamide	S 3 300µg	17	13-16	12
Tetrazyklin	TE 30µg	22	17-21	16

Tabelle 10: Gegen Antibiotika getestete Bakterienstämme aus dem Untersuchungsgut der Dissertation plus Kontrollstamm

Nr.	Typisiererergebnis	Isolationsort	Isolationstag
1	<i>S. Hadar</i> , 6,8 : z10 : e,n,x	Fermenter I, Biogasanlage	06.04.1999
2	<i>S. Tennessee</i> , 6,7 : z29 : -	Fermenter II, Biogasanlage	26.04.1999
3	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	06.04.1999
4	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	06.04.1999
5	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT120, BT: a	Fermenter I, Biogasanlage	06.04.1999
6	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	06.04.1999
7	<i>S. Agona</i> , 4,12 : f,g,s : -	Lagune	12.04.1999
8	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	19.04.1999
9	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	19.04.1999
10	<i>S. Derby</i> , 4,12 : f,g : -	Fermenter I, Biogasanlage	19.04.1999
11	<i>S. Agona</i> , 4,12 : f,g,s : -	Fermenter II, Biogasanlage	19.04.1999
12	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	26.04.1999
13	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	26.04.1999
14	<i>S. Agona</i> , 4,12 : f,g,s : -	Fermenter I, Biogasanlage	26.04.1999
15	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	17.05.1999
16	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	17.05.1999
17	<i>S. Derby</i> , 1,4,12 : f,g : -	Fermenter I, Biogasanlage	17.05.1999
18	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	31.05.1999
19	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	31.05.1999
20	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	31.05.1999
21	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	07.06.1999

(Fortsetzung folgt)

(Fortsetzung Tabelle 10)

Nr.	Typisiererergebnis	Isolationsort	Isolationstag
22	<i>S. Derby</i> , 1,4,12 : f,g : -	Fermenter I, Biogasanlage	07.06.1999
23	<i>S. Derby</i> , 1,4,12 : f,g : -	Fermenter I, Biogasanlage	07.06.1999
24	<i>S. Typhimurium</i> , 4,5,12 : i . 1,2 LT: DT104 / BT: a	Lagune	02.03.1998
25	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	02.03.1998
26	<i>S. Typhimurium</i> , Zoosaloral®-Impfstamm, (Lebendimpfstoff für Kälber)	Lebendimpfstoff, Impfstoffwerk Dessau-Tornau	Ch.-B.: 820598 Verw. bis: 11.06.00
27	<i>S. Typhimurium</i> , Zoosaloral®-Impfstamm, (Lebendimpfstoff für Kälber)	Lebendimpfstoff, Impfstoffwerk Dessau-Tornau	Ch.-B.: 820598 Verw. bis: 11.6.00
28	<i>S. Typhimurium</i> , Zoosaloral®-Impfstamm, (Lebendimpfstoff für Kälber)	Lebendimpfstoff, Impfstoffwerk Dessau-Tornau	Ch.-B.: 820598 Verw. bis: 11.6.00
29	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Milchviehanlage I	17.1.2000
30	<i>S. Typhimurium</i> , 4,5,12 : i . 1,2 LT: ut / BT: b	Milchviehanlage I	17.1.2000
31	<i>S. Anatum</i> ; 3,10 : e,h : 1,6	Fermenter I	17.1.2000
32	<i>S. Anatum</i> ; 3,10 : e,h : 1,6	Fermenter I	17.1.2000
33	<i>S. Havana</i> ; 13,23 : f,g : -	Fermenter II	17.1.2000
34	<i>S. Tennessee</i> ; 6,7 : z29: -	Fermenter II	17.1.2000
35	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Lagune	17.1.2000
36	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	Lagune	17.1.2000
37	<i>S. Tennessee</i> ; 6,7 : z29: -	Fettabscheiderrückstände	17.1.2000
38	<i>S. Tennessee</i> ; 6,7 : z29: -	Fettabscheiderrückstände	17.1.2000
39	<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923	Stammsammlung des Institutes	

3.5 Bakteriologische Arbeitsmethoden

3.5.1 Auswahl der Testkeime

Zur Untersuchung der Tenazität von Salmonellen in der Gülle und in den zu testenden Medien wurde der Stamm *S. Typhimurium*, Lysotyp DT104/L, Biochemotyp a verwendet. Dieser Stamm wurde von der Promovendin am 2.3.1998 aus der Lagune der Biogasanlage in Oberlungwitz/Sachsen isoliert.

Die Testung der Antibiotikaempfindlichkeit erfolgte mit 35 isolierten Salmonellenstämmen aus der Milchviehanlage I mit angegliederter Biogasanlage, aus dem Sammelbehälter sowie aus Fettabscheiderinhalten. Weiterhin wurden drei *S. Typhimurium* Zoosaloral®-Impfstämme (LT: DT009, BT:a) aus dem Impfstoffwerk Dessau-Tornau und der Stamm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aus der Stammsammlung des Institutes getestet. In der Tabelle 10 (S. 47f) sind diese Stämme mit Isolationsort und -datum aufgeführt.

3.5.2 Herstellung der Testkeimsuspensionen

3.5.2.1 Herstellung der Testkeimsuspensionen (konventionelle Methode)

Die Suspensionen des Testkeimes *S. Typhimurium* DT104 wurden benötigt, um die Überlebensfähigkeit des Keimes in den verschiedenen Medien (Gülle, Ultrazentrifugat) zu untersuchen.

Vom Testkeim *S. Typhimurium* DT104 wurde eine Reinkultur auf einer Blutagarplatte mit 5 % Schafblut angelegt und bei 6°C im Kühlschrank aufbewahrt. Nach zwei Wochen erfolgte eine Überimpfung der Kultur auf eine frische Blutagarplatte.

Zur Herstellung der Keimsuspensionen wurden unter sterilen Kautelen mittels eines Glasstabes Material von den Reinkulturen der Stammsammlung entnommen und die benötigte Menge (100-500 ml) Standard-I-Nährbouillon (Fa. Merck) beimpft. Anschließend wurde die Bouillon 24 Stunden bei 37°C bebrü-

tet und dabei kontinuierlich (100 U/min) geschüttelt. Die Keimdichte der Suspensionen betrug danach 5×10^8 bis 5×10^9 KBE/ml.

3.5.2.2 Herstellung der Testkeimsuspensionen zur Untersuchung des Einflusses von organischen Säuren auf das Überleben von *S. Typhimurium* DT104

Erwartungsgemäß zeigen Säuren einen deutlichen Eiweißfehler, dies musste in den Versuchen, in denen Testkeimsuspensionen in eine Säurelösung gegeben wurden, berücksichtigt werden. Die Ursache eines Eiweißfehlers liegt darin, dass in Abhängigkeit von der Zahl der freien Aminogruppen Bindungsmöglichkeiten im Eiweiß für die Säuren bestehen. Hier kam deshalb eine modifizierte Nährlösung aus 10 % Standard-I-Nährbouillon (Fa. Merck) und 90 % Ringerlösung (Fa. Merck) zum Einsatz. Diese wurde mit der Salmonella-Reinkultur beimpft und 24 Stunden bei 37°C im Wasserbad (GYROTORY®, Water bath shaker, Model G76) geschüttelt. Danach konnte eine Keimdichte von 8×10^8 bis 2×10^9 KBE/ml ermittelt werden.

3.5.3 Quantitativer Nachweis von Salmonellen mittels KOCH'schem Oberflächenverfahren

Das KOCH'sche Oberflächenverfahren wendete die Promovendin immer dann zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl der Testkeimsuspensionen an, wenn Salmonellen in sterile Medien gegeben wurden und mit einer Verunreinigung durch andere Keime nicht zu rechnen war, sowie für ausgewählte hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der Gülle über einer Salmonella-Keimzahl von 100 KBE/ml.

Zur Bestimmung wurden Verdünnungsreihen der keimhaltigen Materialien mit steriler Ringerlösung angelegt und von jeder Verdünnung sowie der unverdünnten Probe je zwei Platten XLD (Xylose-Lysin-Desoxycholat)-Agar (Fa. Merck) mit 0,1 ml beimpft. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C kamen nach

Möglichkeit nur Platten mit mehr als 20 und weniger als 300 Kolonien je Platte zur Auszählung.

Die Berechnung der Keimzahl (KZ) erfolgte über die Errechnung des gewichteten Mittelwertes \bar{c} nach folgenden Formeln:

$$KZ = \bar{c} \times 10 \times \frac{1}{10^{-n}} \qquad \bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1}$$

- \bar{c} = gewichteter Mittelwert
- 10^{-n} = niedrigste auswertbare Verdünnungsstufe
- $\sum c$ = Summe der Kolonien aller ausgezählten Platten
- n_1 = Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
- n_2 = Anzahl der Platten der nächsthöheren Verdünnungsstufe

Die Kontrolle der Serovaridentität erfolgte mit poly- und monospezifischen Antiseren (Fa. SIFIN). Die Grenze des Nachweisverfahrens liegt bei 4,5 koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml.

3.5.4 Quantitativer Nachweis von Salmonellen (MPN-Verfahren)

Die Bestimmung der nativen Salmonellenkonzentration im Rinderflüssigmist und den verschiedenen Fermentationsstufen erfolgte nach dem MPN-Verfahren (most probable number) (NÄVEKE und TEPPER 1979). Das Prinzip besteht in der Bestimmung eines Keimtitors, d. h. es wird das kleinste Volumen, in dem gerade noch ein Mikroorganismus durch seine Vermehrung nachweisbar ist, als Grenzverdünnung bestimmt. Mit dieser Technik lassen sich auch wenige und subletal geschädigte Erreger quantitativ nachweisen, da mit einer Voranreicherung gearbeitet wird. Die untere Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 0,03 KBE/ml. Durch mehrere parallel angelegte Kulturen wird der Einfluss des Zufalls eingeschränkt und das Verfahren statistisch auswertbar.

Bei der Durchführung des MPN-Verfahrens wurde in drei Parallelansätzen in Erlenmeyerkolben (250 ml, DURAN[®], Fa. Schott) je 10 ml Untersuchungsmaterial in 90 ml gepuffertes Peptonwasser (Fa. Merck) gegeben und 30 Minuten bei 37°C mit 120 U/min geschüttelt. Zusätzlich wurden dreimal 1 ml der Ausgangsproben in dreimal 9 ml gepuffertes Peptonwasser inokuliert, gut gemischt und danach je 1 ml pro Parallelansatz in die nächsthöhere Verdünnungsstufe pipettiert. Die Verdünnung wurde in jedem Versuch so lange fortgesetzt, bis ein Negativbefund in der höchsten Stufe sicher zu erwarten war.

Die Voranreicherung im gepufferten Peptonwasser dient der Wiederbelebung subletal geschädigter Salmonellen. Danach erfolgte eine selektive Anreicherung zur Hemmung der Begleitflora und Begünstigung des Salmonellenwachstums. Als Medium wurde die Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT und VASSILIADIS (RV-Bouillon, Fa. Merck) eingesetzt. Bei der RV-Bouillon handelt es sich um eine von VASSILIADIS et al. (1976) modifizierte Rappaport-Lösung mit weniger Malachitgrün und weniger MgCl₂, erniedrigtem pH-Wert und besserem Wachstum von Salmonellen bei 42°C.

Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37°C wurden je 0,1 ml von jeder Pepton-Voranreicherungsstufe in jeweils 10 ml des Selektivmediums gegeben und bei 42°C 24 Stunden inkubiert. Von jeder Rappaport/Vassiliadis-Selektivanreicherungsstufe wurde ein Drei-Ösenausstrich auf XLD- und Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose (BPLS)-Agar gemacht. Nach einer 24-stündigen Bebrütung erfolgte die Überimpfung Salmonella-verdächtiger Kolonien auf Standard-I-Agar (Fa. Merck). Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C wurden verdächtige Kolonien einer Objektträgeragglutination unterzogen und mittels O- und H-Antiseren (Fa. SIFIN) eine Serovarbestimmung des Salmonellenstammes durchgeführt.

Die Anzahl der im Grenzbereich des Wachstums nachweisbaren positiven Parallelansätze von drei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen wurde zum Erstellen eines dreistelligen MPN-Codes herangezogen (DE MAN 1983). Die Berechnung der Salmonella-Keimzahl/ml erfolgte anhand der ermittelten MPN-Codes auf der Grundlage der von MC CRADY (1915) entwickelten Wahrscheinlichkeitstabellen. Für die Berechnungen wurden die MPN-Tabellen nach DE MAN (1983) (s. Kap. 3.8.3, S. 57) verwendet.

3.5.5 Qualitativer Nachweis der Salmonellen

Zum qualitativen Nachweis der Salmonellen wurden die Probenansätze des MPN-Verfahrens genutzt.

Von Salmonella-verdächtigen Kolonien auf BPLS- oder XLD-Agar wurden Reinkulturen auf BPLS-Agar und Standard-I-Nähragar angelegt. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C erfolgte mittels Objektträgeragglutination eine serologische Identifizierung. Die Diagnostik im Institut wurde mit poly- und monospezifischen Testseren (Fa. SIFIN) durchgeführt.

In Einzelfällen erfolgte eine biochemische Identifizierung der Kolonien mit dem API 20E (Fa. BioMerieux) oder BBL Chrystel (Fa. Becton Dickinson).

Die Typisierung der nicht zu *S. Typhimurium*- und *S. Enteritidis* gehörenden Isolate führte bis Ende 1998 die Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen in Leipzig aus. Ab 1999 erfolgte die Feintypisierung dieser Serovare zusätzlich zu den eigenen Untersuchungen im Robert-Koch-Institut, Bereich Wernigerode.

3.5.6 Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl mittels KOCH'schem Oberflächenverfahren

Die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl erfolgte nach dem KOCH'schen Oberflächenverfahren. Dazu wurden zunächst aus dem zu untersuchenden Material nach ausreichender Durchmischung 1 ml in 9 ml sterile Ringerlösung inokuliert und in weiteren Schritten jeweils im Verhältnis eins zu neun verdünnt. Nach gründlicher Durchmischung wurden jeweils 0,1 ml der ausgewählten Verdünnungsstufen auf zwei parallel angelegte Standard I-Agarplatten pipettiert und mit einem Drigalskispatel gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Die Auswertung dieser Platten erfolgte nach einer 24-stündigen Bebrütung bei 37°C.

Aus je zwei parallel angelegten Platten pro Verdünnungsstufe wurde der gewichtete Mittelwert (vgl. Kap. 3.5.3) gebildet und die Koloniezahlen auf 1 ml des Ausgangsmaterials berechnet.

3.5.7 Bestimmung der Anzahl der *Enterobacteriaceae*

Die Bestimmung der *Enterobacteriaceae* erfolgte wie die Bestimmung der Gesamtkeimzahl nach dem KOCH'schen Plattenverfahren. Aus den ausgewählten Verdünnungsstufen wurden nach gründlicher Durchmischung je 0,1 ml auf zwei parallele Platten MacCONKEY-Agar (Fa. Merck) pipettiert und mit einem sterilen Drigalskispatel ausgestrichen. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C lassen sich die Kolonien auszählen und das Ergebnis auf 1 ml des Ausgangsmaterials berechnen (vgl. Kap. 3.5.3).

MacCONKEY-Agar ist ein Selektivagar zur Isolierung von Enterobacteriaceen. Gallensalze und der Farbstoff Kristallviolett hemmen weitgehend die gram-positive Begleitflora. Außer den typisch Laktose-positiven roten Kolonien wurden auch die transparenten Laktose-negativen Kolonien bei der Auswertung mit einbezogen. Um jedoch „falsch“ positive Keime, wie Pseudomonaden und Aeromonaden, von der Zählung auszuschließen, wurden in Zweifelsfällen weitere diagnostische Schritte wie das Anlegen einer Reinkultur, den Cytochromoxidasetest (Bactident Oxidase, Fa. Merck) oder ein API 20E (API bioMerieux) durchgeführt, um die Zugehörigkeit der auf dem Agar gewachsenen Mikroorganismen zur Familie der *Enterobacteriaceae* zu bestätigen.

3.5.8 Bestimmung der Anzahl von *Escherichia coli*

Die Keimzahl von *Escherichia coli* wurde mit Hilfe des KOCH'schen Oberflächenverfahrens ermittelt. Nach dem Herstellen von Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Probe in steriler Ringerlösung wurde je auswertbarer Verdünnungsstufe je 0,1 ml auf ENDO-Agar pipettiert und mittels sterilem Drigalskispatel eingerieben. Nach einer Bebrütung von 24 Stunden bei 37°C wurde die Auszählung der Kolonien mit Fuchsinglanz durchgeführt. Die Berechnung der

Koloniezahl pro Milliliter erfolgte mit der Formel für den gewichteten Mittelwert.

3.5.9 Bestimmung der Anzahl der Enterokokken

Die Anzahl der Enterokokken im Untersuchungsmaterial wurde mit dem Enterokokken-Selektivagar nach SLANETZ und BARTLEY (Fa. Merck) bestimmt. Sie bilden auf diesem Agar rötliche bis braune Kolonien mit hellem Hof. Die gramnegative Begleitflora wird durch Natriumazid gehemmt. Die typische Färbung der Enterokokken entsteht durch die Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) zu Triphenylformazin.

Aus den ausgewählten Verdünnungsstufen in Ringerlösung wurden je 0,1 ml auf zwei Platten pro Verdünnungsstufe pipettiert und mit einem sterilen Dri-galskispatel auf der Agaroberfläche gleichmäßig verteilt. Nach einer Bebrütungsdauer von 48 Stunden bei 37°C wurden die Kolonien ausgezählt. Dabei wurden jedoch nur Kolonien mit einem Durchmesser von 0,5 bis 2 mm berücksichtigt. Aus der Koloniezahl zweier parallel angelegter Platten wurde der gewichtete Mittelwert gebildet und auf 1 ml Untersuchungsmaterial berechnet.

3.6 Bestimmung des pH-Wertes

Alle pH-Werte der untersuchten Proben wurden mit dem pH-Meter MP 120 (Fa. Mettler-Toledo, Wien, Austria) ermittelt. Es erfolgten zwei Messungen von jeder Probe mit anschließender Ermittlung des Mittelwertes. Das Gerät wurde in vom Hersteller empfohlenen Abständen ordnungsgemäß kalibriert.

3.7 Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes

Die Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes (TS) des Untersuchungsmaterials erfolgte mit dem elektronischen Feuchtigkeitsbestimmer „Moisture Analy-

zer MA30“ (Fa. Sartorius, Göttingen) jeweils als Mittel aus zwei Messwerten. Je ca. 10 g jeder Probe wurden ausgewogen und bei 105°C getrocknet.

3.8 Statistische Berechnungen

Alle statistischen Berechnungen führten wir mit dem Statistikprogramm SPSS for Windows, Version 6.12 (SPSS GmbH Software, München) durch.

3.8.1 Berechnung der Regression

Die Absterbeordnung von Mikroorganismen folgt in der Regel einer Funktion 1. Ordnung („logarithmische“ oder „exponentielle Absterbeordnung“). Bei der üblichen logarithmischen Darstellung der Keimkonzentration entspricht diese Absterbeordnung einer linearen Funktion. Es wird versucht, die Messwerte an das Modell der linearen Funktion anzupassen.

Auf der Grundlage einer Varianzanalyse überprüften wir, ob die Darstellung des Zusammenhangs zwischen \log_{10} -Keimzahl und Zeit durch ein lineares Modell gerechtfertigt ist. Diese Bedingung gilt als erfüllt, wenn die Prüfgröße $F \leq 0,05$ war.

Die Gleichung der linearen Funktion lautet:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x$$

$x = \text{Haltezeit, } y = \log_{10} \text{ KBE/ml}$

SPSS berechnet für die wahren Parameter β_0 und β_1 die Schätzgrößen b_0 und b_1 . Mit dem t-Test wurde geprüft, ob β_0 und β_1 bei Anpassung des linearen Modells signifikant von Null verschieden sind. Bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ lag Signifikanz vor.

Eine Regression wurde nur berechnet, wenn für die beiden Parameter β_0 und β_1 die Bedingung $p \leq 0,05$ erfüllt war. Als weiteres Maß für die Güte der Nähe-

ung diene das Bestimmtheitsmaß B für den Zusammenhang zwischen \log_{10} -Keimzahl und Haltezeit sowie die Breite des 95%-Konfidenzintervalls für die Schätzwerte der Keimzahl (\log_{10} KBE/ml). Zusätzlich wurden die 95%-Konfidenzbänder für die individuellen Werte berechnet.

3.8.2 Bestimmung des D-Wertes

Beim Vorliegen einer lineareren Regression lässt sich der D-Wert als Kehrwert des Betrages des Regressionskoeffizienten b_1 (Steigung der Regressionsgeraden) berechnen: $D = [b_1]^{-1}$. Das 95%-Konfidenzintervall wird analog aus den Kehrwerten des Konfidenzintervalls für b_1 berechnet. Für die Berechnung eines D-Mittelwertes aus drei Wiederholungsversuchen wurde aus allen Einzelwerten der drei Versuche eine gemeinsame Regressionsgerade berechnet und aus deren Steigung wie oben beschrieben der D-Mittelwert errechnet.

3.8.3 Kontrolle der MPN-Meßwerte

Den ermittelten MPN-Codezahlen lassen sich nach der Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens Kategorien von 1 bis 3 zuordnen (DE MAN 1983). Es wurden für die Berechnungen nur Codezahlen der Kategorie 1 verwendet, da die Genauigkeit der damit erzielten Ergebnisse am höchsten ist. Zu jeder Codezahl kann aus den verwendeten MPN-Tabellen (DE MAN 1983) der exakte 95%-Konfidenzbereich abgelesen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Keimzahlen in der Gülle der Milchviehanlage I, in den Fermentern I und II und der Lagune

Die Gesamtkeimzahl der Gülle reduzierte sich auf dem Weg von der Milchviehanlage I bis zur Lagune um etwa eine Zehnerpotenz. Der Gehalt an *Enterobacteriaceae* wurde um etwa zwei Zehnerpotenzen auf 10^4 gesenkt. *Escherichia coli* wurden zu Beginn der Fermentation um über zwei Zehnerpotenzen reduziert und stiegen danach leicht an. Enterokokken konnten im Verlauf kontinuierlich von annähernd 10^7 auf 3×10^4 gesenkt werden. Der Gehalt an Salmonellen schwankte um eine Zehnerpotenz von $1,5 \times 10^1$ bis 9×10^2 . Die pH-Werte lagen im alkalischen Bereich. Die Trockensubstanzgehalte nahmen von anfänglich 9,51 in der Milchviehanlage I bis auf 3,82 in der Lagune ab (Tabelle 11).

Tabelle 11: Keimzahlen (in KBE/ml), pH-Werte und Trockensubstanzgehalte (%) im Rinderflüssigmist auf dem Weg von der Milchanlage I bis zur Lagune

	MVA I	Fermenter I	Fermenter II	Lagune
Gesamtkeimzahl	3,60E+07	2,10E+06	2,70E+06	1,90E+06
Enterobacteriaceae	9,10E+05	8,40E+03	1,10E+04	7,90E+03
E. coli	6,70E+05	3,30E+03	1,20E+04	5,60E+03
Enterokokken	9,10E+06	3,20E+05	1,50E+05	3,20E+04
Salmonellen	1,50E-01	4,00E-02	9,00E-02	7,00E-02
pH-Wert	7,11	7,79	7,71	7,55
TS (%)	9,51	6,73	6,17	3,82

4.2 Vorkommen von Salmonellen in der Gülle der Milchviehanlage I, in Fettabscheiderinhalten und im Fermentationsmaterial der nachgeschalteten Biogasanlage

Im Untersuchungszeitraum 1997-2000 wurden in 22 Durchgängen insgesamt 87 qualitative und quantitative Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen in der anfallenden Gülle der Milchviehanlage I (n = 22), in den Fermentern I (n = 13) und II (n = 20), in der Lagune (n = 22) sowie in den Fettabscheiderinhalten (n = 10) durchgeführt.

Aus den 22 Probenentnahmen der Gülleaufbereitung aus der Milchviehanlage I wurde in 21 Proben *S. Typhimurium* isoliert (Tabelle 12). Im ersten Fermenter waren 9 von 13 Proben Salmonella-positiv. Isoliert wurden: *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Montevideo*, *S. Derby*, *S. Hadar* und *S. Anatum*. Die Hälfte der Proben des zweiten Fermenters waren Salmonella-positiv. Unter anderem waren die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Agona* nachweisbar. Aus der Lagune wurden 17 der 22 Proben positiv auf Salmonellen getestet. In 14 Proben wurde *S. Typhimurium* nachgewiesen, in zwei *S. Agona*, in je einer *S. Hadar* und *S. Mbandaka*. Vier Proben von zehn Untersuchungen der Fettabscheiderinhalte waren mit Salmonellen kontaminiert. In den Proben wurden unter anderem die Serovare *Tennessee*, *Enteritidis* und *Ohio* nachgewiesen.

Tabelle 12: Aus der Milchviehanlage I und der mesophilen Gülleaufbereitung isolierte Anzahl an Salmonellenstämmen in den Jahren 1997-2000

Häufigkeit der isolierten Salmonellenstämmen 1997- 2000					
	MVAI (n = 22)	Fermenter I (n = 13)	Fermenter II (n = 20)	Lagune (n = 22)	Fettabscheider (n = 10)
Salmonella positiv	21	9	10	17	4
<i>S. Typhimurium</i> *	21	2	3	14	0
<i>S. Agona</i>	0	3	4	2	0
<i>S. Montevideo</i>	0	1	2	0	0
<i>S. Derby</i>	0	3	0	0	0
<i>S. Tennessee</i>	0	0	2	0	1
<i>S. Enteritidis</i>	0	0	1	0	2
<i>S. Hadar</i>	0	2	0	1	0
<i>S. Ohio</i>	0	0	0	0	1
<i>S. Mbandaka</i>	0	0	0	1	0
Salmonella Subspez.1 / 9: I,v : -monophasische Variante	0	0	0	0	1
<i>S. Anatum</i>	0	1	0	0	0
<i>S. Havanna</i>	0	0	1	0	0

* ohne weitere Differenzierung

Da 1998 aus der Lagune nur einmal, am 02.03.1998, der epidemiologisch wichtige Stamm *S. Typhimurium* DT104 isoliert wurde, werden in Tabelle 13 beispielhaft die Einzelergebnisse des Jahres 1998 vorgestellt. Anfangs war in allen Proben der Salmonella-Impfstamm in geringer Keimzahl nachweisbar. Er wurde in der Gülle der Milchviehanlage I und in der Lagune in geringerer Konzentration isoliert. Anschließend wurde der Impfstamm in unterschiedlichen Keimzahlen aus der Gülle der Milchviehanlage I isoliert. Aus dem Material des ersten Fermenters konnte *S. Agona* und aus dem zweiten Fermenter *S. Montevideo* nachgewiesen werden. Dreimal waren im ersten und zweiten Fermenter keine Salmonellen nachzuweisen. Aus der Lagune wurde nur einmal *S. Typhimurium* DT104, danach wieder der Impfstamm isoliert.

Tabelle 13: Ergebnisse qualitativer und quantitativer Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen in der anfallenden Gülle der Milchviehanlage I, des ersten und zweiten Fermenters der Biogasanlage und der Lagune im Jahr 1998

Datum	Keimzahl in KBE/ml und Typisierung der Salmonellen folgender Entnahmestellen			
	Milchviehanlage I	Fermenter I	Fermenter II	Lagune
09.02.98	0,28 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm	0,07 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm	0,04 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm	0,09 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm
16.02.98	2 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm	5 <i>S. Agona</i>	0,23 <i>S. Montevideo</i>	0,07 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm
02.03.98	0,15 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm	n.n.	n.n.	2 <i>S. Typhimurium</i> LT: DT104, BT: a
09.03.98	1,5 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm	n.n.	5 <i>S. Agona</i> , <i>S. Montevideo</i>	0,15 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm
16.03.98	7 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm	0,23 <i>S. Agona</i> , <i>S. Montevideo</i>	0,4 <i>S. Agona</i>	0, 23 <i>S. Typhimurium</i> , LT: DT009, BT:a Zoosaloral®-Impfstamm

n.n.: nicht nachweisbar

4.3 Untersuchungen zum Überleben von *S. Typhimurium* DT104 in der Gülle der Milchviehanlage I, im Substrat des Fermenters I und II und im Material der Lagune bei 37°C

Es sollte überprüft werden, ob das Überleben von *S. Typhimurium* von den Fermentationsvorgängen in der Biogasanlage beeinflusst wird oder ob allein die beiden Parameter „Substrat Gülle“ und eine Temperatur von 37°C zur Inaktivierung der Salmonellen führen können.

In der Gülle der Milchviehanlage I überlebten die Salmonellen länger als im ersten oder zweiten Fermenter oder der Lagune. Während bereits im ersten Fermenter nach drei Tagen bzw. im zweiten Fermenter und in der Lagune nach

vier Tagen keine Salmonellen nachgewiesen werden konnten, waren bei Versuchsende nach fünf Tagen in der Gülle der Milchviehanlage noch Salmonellen im Bereich von 10^2 KBE/ml nachweisbar (Abbildung 6, Anhang: Tabelle 17).

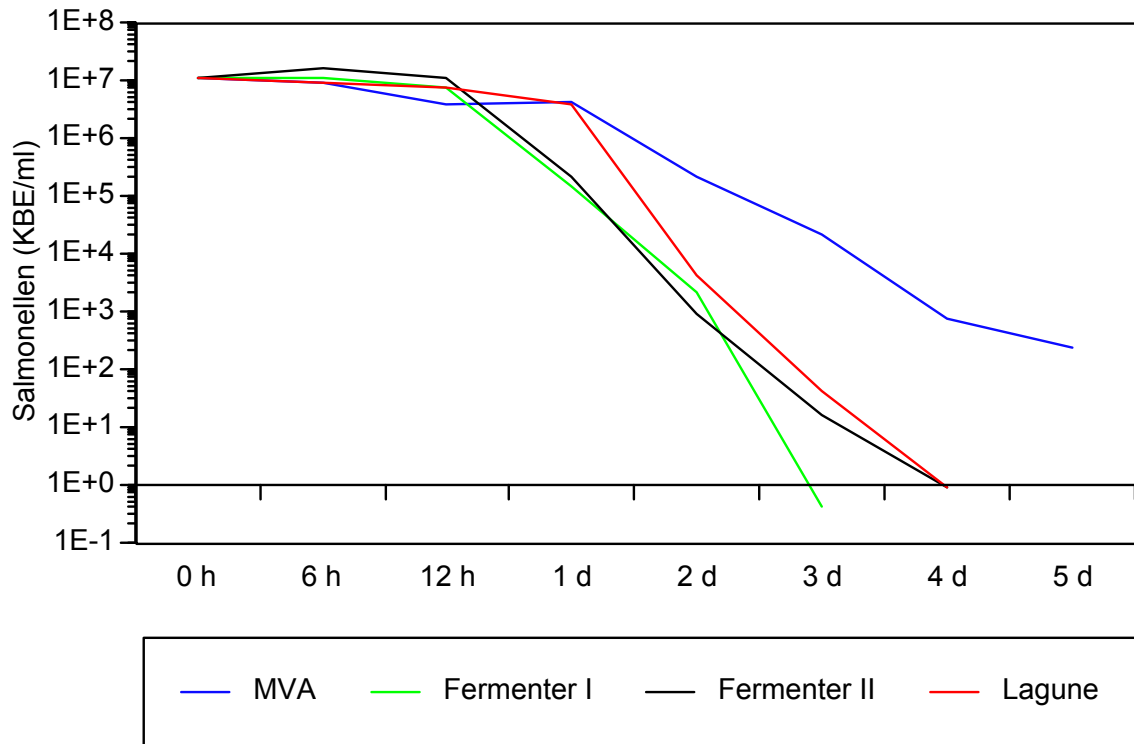


Abbildung 6: Überleben von *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) in der Gülle der Milchviehanlage I, im Substrat des ersten und zweiten Fermenters sowie im Material der Lagune bei einer Lagerungstemperatur von 37°C

Bei zwei Versuchswiederholungen entsprachen die Salmonellenzahlen in der Gülle der Milchviehanlage I und im Fermenter II den obengenannten Ergebnissen. Im Fermenter I überlebten die Salmonellen drei und fünf Tage, in der Lagune jeweils vier Tage lang.

4.4 Untersuchungen zur Tenazität von *S. Typhimurium* DT104 in der flüssigen Phase (Ultrazentrifugation) der Gülle der Milchviehanlage I, der Substrate der Fermenter I und II sowie der Lagune bei 37°C

Nach der Ultrazentrifugation der o. g. Materialien wurde die Tenazität von *S. Typhimurium* nach Überführung in ein bakterienfreies Substrat getestet (vgl. Kap. 3.2.4). Unter diesen Bedingungen fand in der Gülle der Milchviehanlage I sowie im Substrat der Lagune über fünf Tage eine kontinuierliche Senkung der Salmonellengehalte um zwei bzw. drei Zehnerpotenzen von 10^7 auf 10^4 KBE/ml statt (Abbildung 7, Anhang: Tabelle 18). In beiden Fermentern verlief die Keimreduktion wesentlich schneller und nach fünf Tagen waren keine Salmonellen nachweisbar.

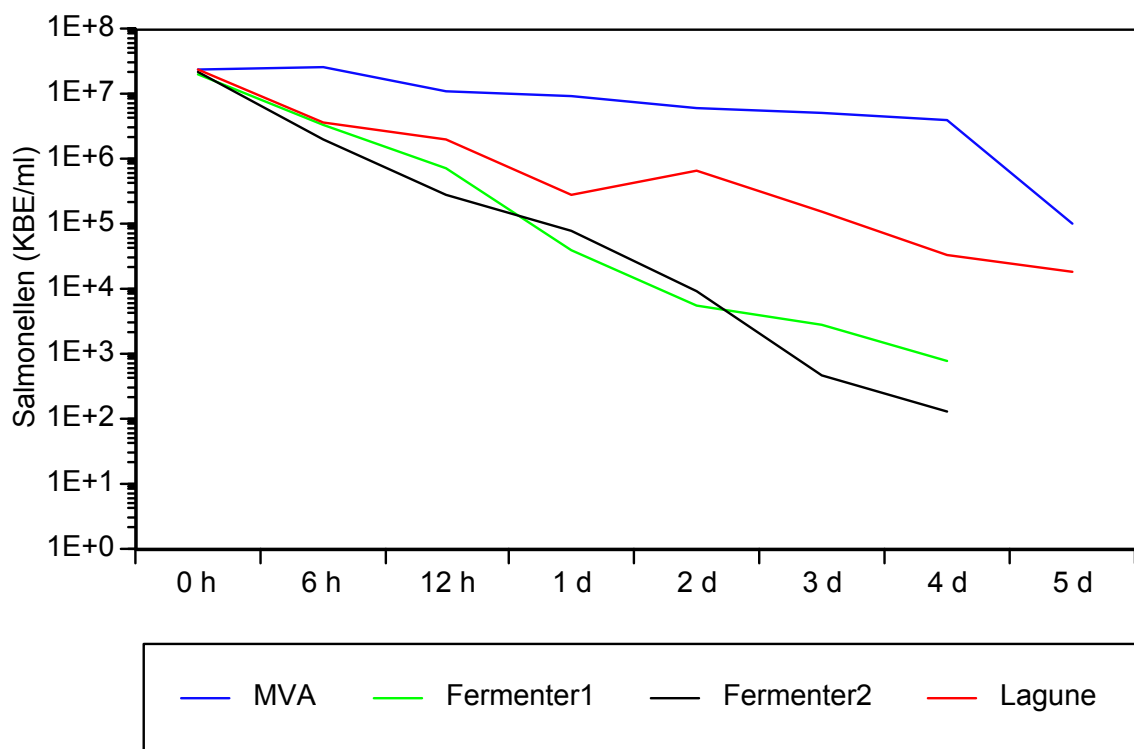


Abbildung 7: Überleben von *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) in der flüssigen Phase (Ultrazentrifugation) der Gülle der Milchviehanlage I, der Substrate des ersten und zweiten Fermenters sowie der Lagune bei einer Lagerungstemperatur von 37 °C

In beiden Versuchswiederholungen verlief die Inaktivierung der Salmonellen im Ultrazentrifugat der Gülle und des Substrates der Lagune identisch. Im Substrat des ersten Fermenters waren nach vier bzw. fünf Tagen keine Salmonellen nachweisbar, im Substrat des zweiten Fermenters waren bei beiden Wiederholungen auch nach fünf Tagen noch Salmonellen in geringer Zahl vorhanden.

4.5 Überlebenszeiten nativer Salmonellen im Rinderflüssigmist

In den orientierenden Untersuchungen zu den Überlebenszeiten nativer Salmonellen im Rinderflüssigmist wurde in der ersten Probe eine Ausgangskeimzahl von 20 KBE/ml Salmonellen festgestellt. Bei der Aufbewahrung bei 35°C zeigte sich eine kontinuierliche Reduktion der Ausgangskeimzahl während der ersten drei Lagerungstage, bis nach vier Tagen keine Salmonellen nachweisbar waren. Die zweite Gülleprobe mit einer Ausgangskeimzahl von 9 KBE/ml erbrachte vergleichbare Ergebnisse (Anhang: Tabelle 19).

Auch bei einer Lagerungstemperatur von 6°C reduzierte sich in der ersten Probe die Ausgangskeimzahl von 20 KBE/ml nach zwei Tagen auf 11 KBE/ml, nach vier Tagen auf 9 KBE/ml. Die Inaktivierung in der zweiten Probe verlief analog. Dies zeigt, dass bei der Lagerung bei 6°C nach vier Tagen immer noch etwa die Hälfte der Ausgangskeimzahl nachweisbar war (Anhang: Tabelle 19).

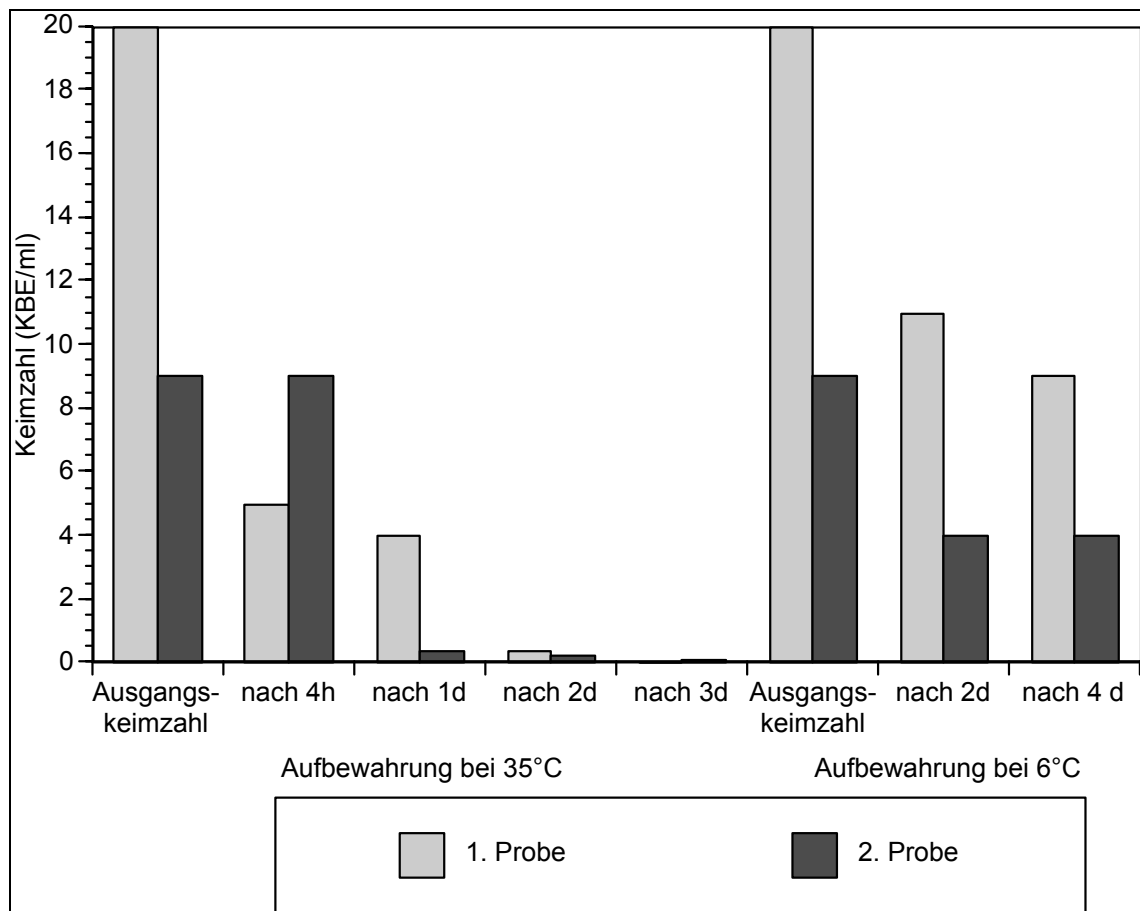


Abbildung 8: Orientierende Untersuchungen zu Überlebenszeiten nativer Salmonellen (KBE/ml) in zwei Proben Rinderflüssigmist bei einer Lagerung von 35°C und 6°C

4.6 Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 7°C gelagerten Gülle sowie des Substrats nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Im Rinderflüssigmist der Milchviehanlage I verringerte sich die Gesamtkeimzahl während einer einjährigen Lagerung bei 7°C um etwa zwei Zehnerpotenzen (Anhang: Tabelle 20a). Auch bei *E. coli* und Enterokokken kam es zu einer deutlichen Reduzierung der Keimzahlen. Von zugegebenen *S. Typhimurium* waren anfangs $1,40 \times 10^7$ KBE/ml mit dem KOCH'schen Plattenverfahren (KP) nachweisbar. Nach 34 Wochen waren mit Hilfe dieser Methode keine *S. Typhimurium* mehr vorhanden. Mit dem MPN-Verfahren konnten noch bis zum Ab-

schluss des Versuchs nach einem Jahr bis zu drei Zehnerpotenzen koloniebildende Einheiten von *S. Typhimurium* nachgewiesen werden.

In der Versuchswiederholung (Anhang: Tabelle 20b) verlief die Entwicklung der Keimzahlen entsprechend. Auffällig war jedoch, dass die Keimzahlen von *S. Typhimurium* im MPN-Verfahren über den Zeitraum von Woche 34 bis 46 einen nahezu plateauförmigen Verlauf im Bereich von 10^4 KBE/ml zeigten, um anschließend deutlich um zwei Zehnerpotenzen abzusinken (Abbildung 9).

Die D-Werte fallen beim KOCH'schen Plattenverfahren in beiden Versuchen identisch aus: in beiden Versuchen reduzierte sich der Gehalt an *S. Typhimurium* pro Tag jeweils um 0,029 Zehnerpotenzen. Im MPN-Verfahren betrugen die D-Werte 0,008 bzw 0,018 Zehnerpotenzen/Tag.

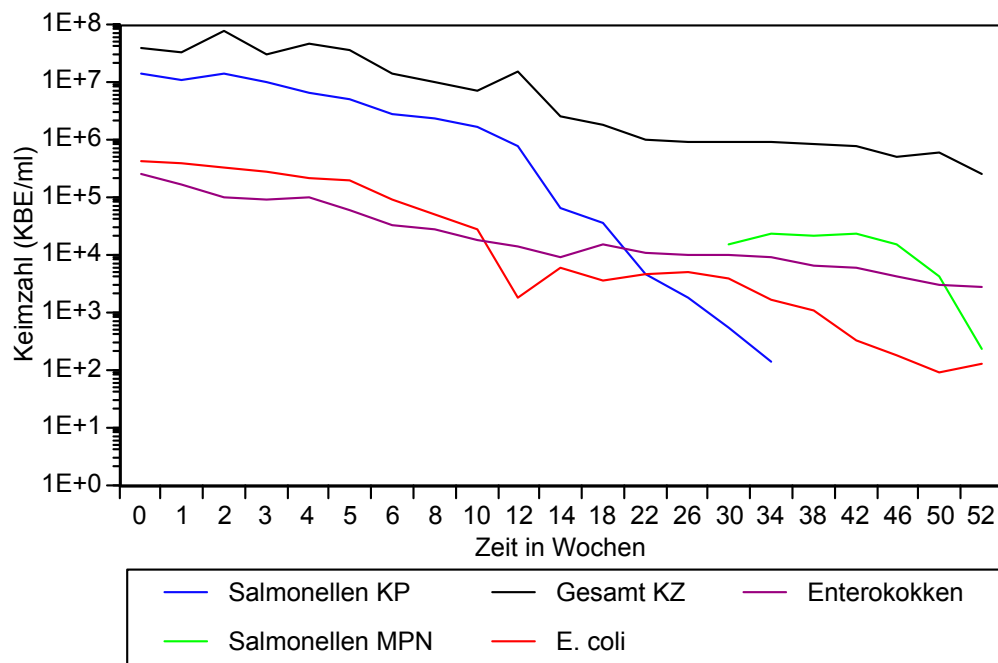


Abbildung 9: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

In der Lagune (Anhang: Tabelle 21a) war die Gesamtkeimzahl zu Beginn etwa gleich hoch wie in dem direkt aus der Milchviehanlage I stammenden Rinder-

flüssigmist und betrug im ersten Versuch $4,60 \times 10^7$ KBE/ml. Im Versuchsaufbau kam es zu einer allmählichen Reduzierung der GKZ um zwei Zehnerpotenzen. Die Konzentration an *E. coli* lag mit $3,10 \times 10^4$ KBE/ml in der Lagune eine Zehnerpotenz niedriger als in der Gülle der Milchviehanlage I. Während in der Gülle zum Ende des Versuchs nach einem Jahr immer noch geringe Gehalte an *E. coli* nachweisbar waren, traten in den Proben der Lagune in beiden Versuchsdurchgängen bereits nach 10 bzw. 12 Wochen keine *E. coli* mehr auf (Anhang: Tabelle 21a/b). Der Gehalt an Enterokokken war in der Lagune jeweils um eine Zehnerpotenz geringer als in der Gülle der MVA und reduzierte sich kontinuierlich bis auf 10^2 KBE/ml (Abbildung 10).

Der Gehalt an *S. Typhimurium* war mit dem KOCH'schen Oberflächenverfahren noch bis zur 30. Woche nachzuweisen. Mit der MPN-Methode waren auch nach einem Jahr in der Lagune noch *S. Typhimurium* zu detektieren. Die Keimgehalte waren etwa ein bis zwei Zehnerpotenzen geringer als in der Gülle der Milchviehanlage I. Dennoch waren bezüglich der Keimreduktion nur sehr geringe Unterschiede festzustellen.

Die Versuchswiederholung (Anhang: Tabelle 21b) erbrachte nur geringfügige Unterschiede. Hier war eine Inaktivierung sowohl von Salmonellen als auch von *E. coli* zwei Tage früher erreicht. Nach einem Jahr waren mit dem MPN-Verfahren noch 10^2 KBE/ml Salmonellen nachweisbar.

Die D-Werte für das KOCH'sche Plattenverfahren (Versuch: 0,034, Wiederholung: 0,028) waren für Substrat aus dem Sammelbehälter vergleichbar mit denjenigen aus der Gülle (beide Versuchsdurchgänge: 0,029). Auch die D-Werte nach dem MPN-Verfahren (Versuch: 0,018, Wiederholung: 0,013) lagen in einem Bereich, der demjenigen des Rinderflüssigmistes entsprach (Versuch: 0,008, Wiederholung: 0,018).

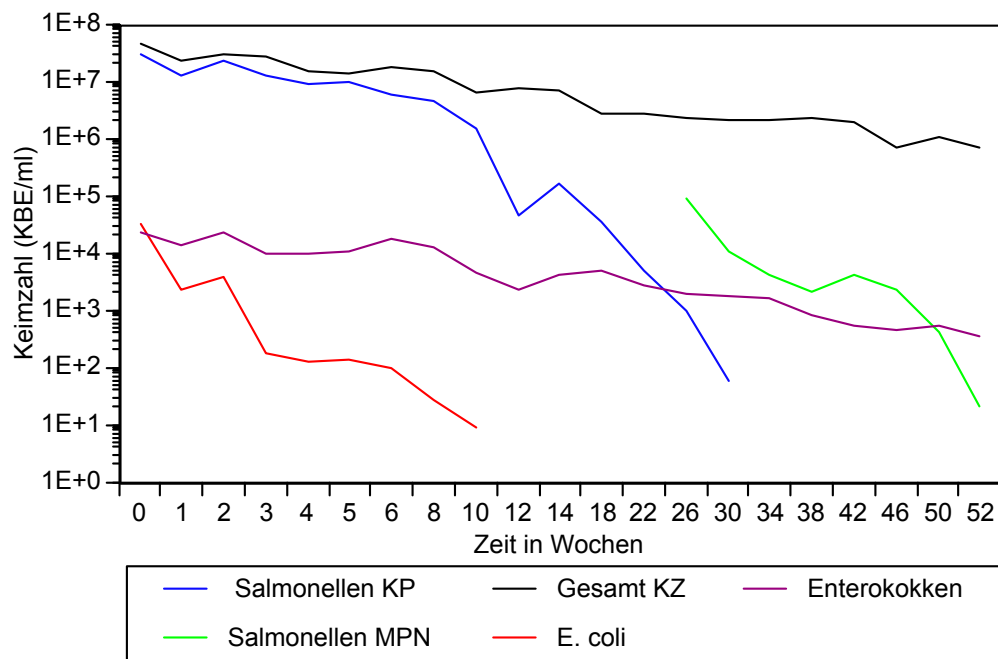


Abbildung 10: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Substrates der Lagune nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Durch den Vergleich mit der Milchviehanlage II sollte geklärt werden, ob möglicherweise in der Milchviehanlage mit Biogasanlage eine andere Flora der Gülle vorhanden war, die das Absterben von *S. Typhimurium* DT104 beeinflussen könnte. In der Milchviehanlage II war die Gesamtkeimzahl der Rindergülle zu Beginn der Versuche mit $8,10 \times 10^7$ KBE/ml (Anhang: Tabelle 22a) bzw. $3,40 \times 10^7$ KBE/ml in der Wiederholung (Anhang: Tabelle 22b) etwa gleich hoch wie in der Milchviehanlage I. Im Laufe des Untersuchungsjahres reduzierte sich die Gesamtkeimzahl bis auf eine Größenordnung von 10^4 KBE/ml und lag damit sowohl im Hauptversuch als auch in der Wiederholung eine Zehnerpotenz niedriger als in der Milchviehanlage I. Die Verläufe der Gehalte an *E. coli* und Enterokokken fielen in beiden Milchviehanlagen nahezu identisch aus.

S. Typhimurium war mittels KOCH'schem Plattenverfahren nur bis zur 26. bzw. 30. Woche nachzuweisen, während dies in der Milchviehanlage I jeweils bis zur 34. Woche möglich war. Mit Hilfe des MPN-Verfahrens war auch nach dieser Zeit eine weitere Reduktion der Keimzahlen bis auf eine bzw. zwei Zehnerpo-

tenzen festzustellen (Abbildung 11). Die D-Werte als Maß für den mittleren Keimrückgang pro Tag betrugen im KOCH'schen Oberflächenverfahren 0,030 bzw. 0,034, im MPN-Verfahren 0,013 bzw. 0,011. Damit entsprachen sie denjenigen der Milchviehanlage I.

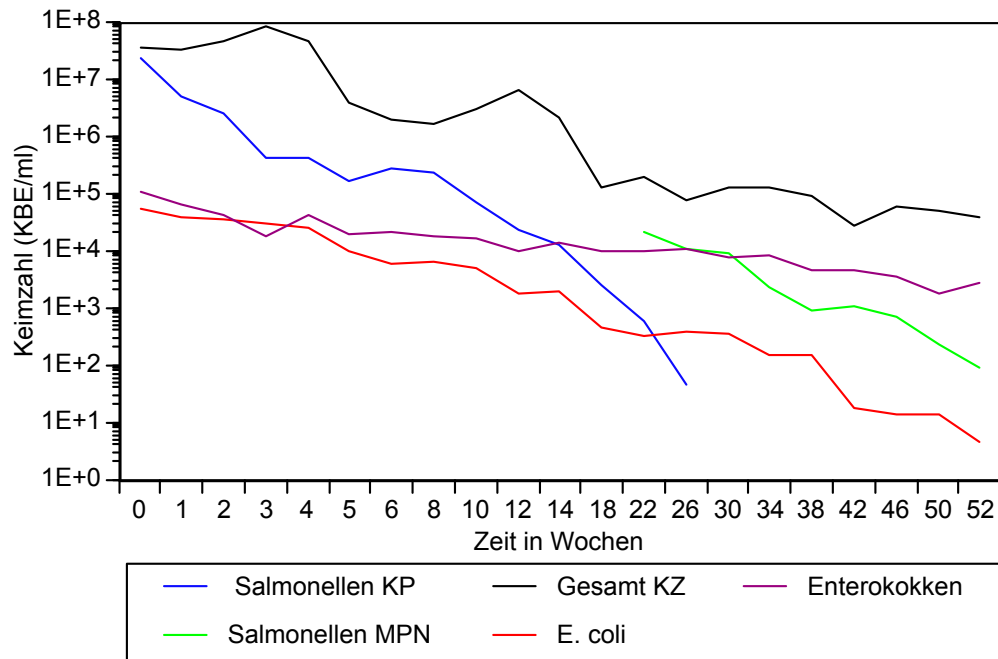


Abbildung 11: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 7°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

4.7 Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 22°C gelagerten Gülle sowie des Substrats nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Bei einer Lagerungstemperatur von 22°C reduzierte sich die Gesamtkeimzahl des Rinderflüssigmistes aus der Milchviehanlage I innerhalb der elfwöchigen Versuchsdauer um zwei Zehnerpotenzen von 10^8 auf 10^6 (Anhang: Tabelle 23a) bzw. 10^5 (Versuchswiederholung, Anhang: Tabelle 23b, Abbildung 12). Enterokokken waren bei der Versuchswiederholung in der zehnten Woche nicht mehr

nachweisbar, im Hauptversuch waren nach elf Wochen noch $8,60 \times 10^1$ KBE/ml vorhanden. Die Keimzahlen von *E. coli* reduzierten sich bis unter die Nachweisgrenze innerhalb von neun bzw. sechs Wochen.

S. Typhimurium war zum Ende beider Versuchsdurchgänge nach acht bzw. sechs Wochen nicht mehr nachweisbar. Die schnelle Reduktion spiegelte sich in den D-Werten wider: Mit 0,126 bzw. 0,181 Zehnerpotenzen/d fielen sie deutlich höher aus als bei einer Lagerung der Rindergülle bei 7°C (beide Versuchsdurchgänge D 0,029).

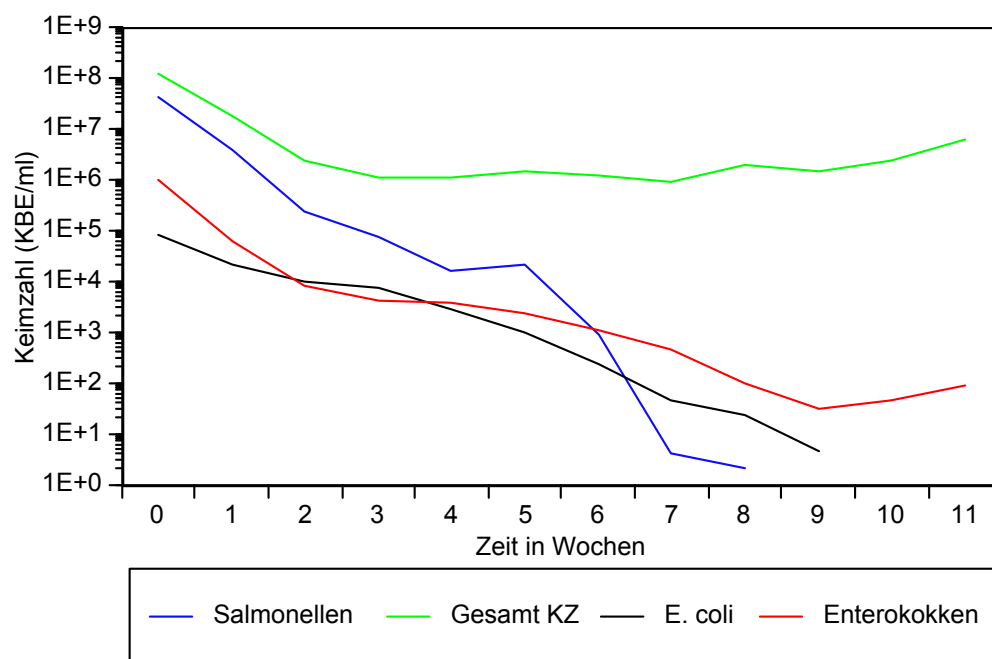


Abbildung 12: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

In der Lagune war die Reduktion der Gesamtkeimzahl und der Enterokokken bei einer Lagerungstemperatur von 22°C nicht unterschiedlich zu derjenigen bei 7°C. *E. coli* war in beiden Versuchsdurchgängen bereits nach ein bis zwei Wochen nicht mehr nachweisbar (Abbildung 13).

Die Reduktion der zugefügten *S. Typhimurium* DT104 war nach fünf bzw. sechs Wochen abgeschlossen. Mit D-Werten von 0,187 bzw. 0,170 (Anhang: Tabelle

24 a/b) reduzierte sich der Salmonellengehalt in der Lagune deutlich schneller als im Rinderflüssigmist gleicher Lagerungstemperatur (Versuch: 0,136, Versuchswiederholung: 0,181).

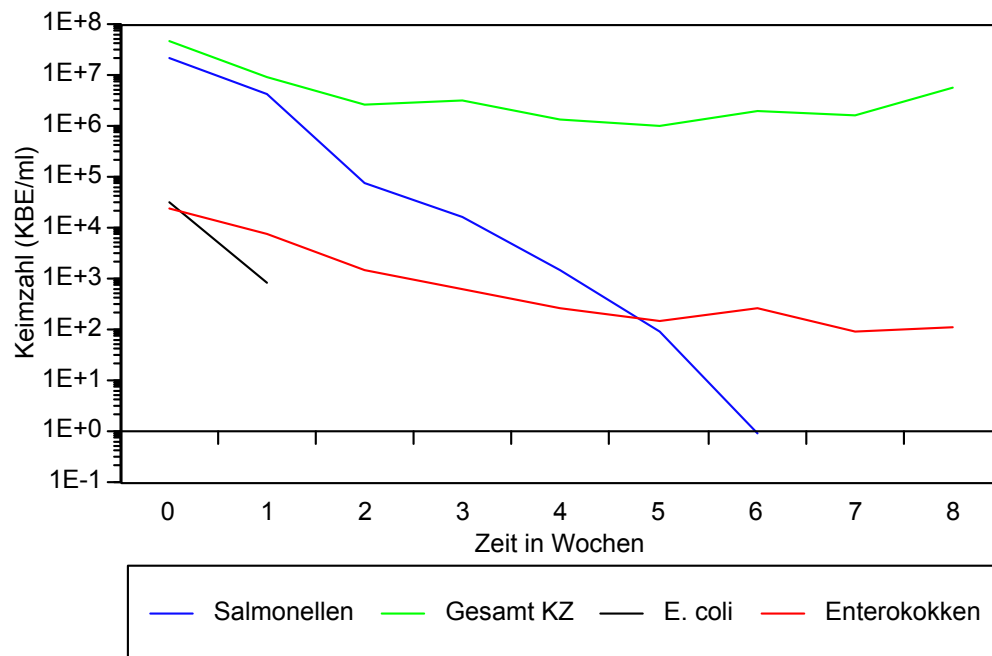


Abbildung 13: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Substrates der Lagune nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

Die Entwicklung der Keimgehalte in bei 22°C gelagertem Rinderflüssigmist der Milchviehanlage II verlief entsprechend den Zahlenwerten der Milchviehanlage I. Auffällig war jedoch ein Anstieg der Gesamtkeimzahl in der achten Woche um eine Zehnerpotenz in beiden Versuchsdurchgängen (Anhang: Tabelle 25 a/b). Enterokokken waren zum Versuchsende nach 8 Wochen nur noch in sehr geringen Konzentrationen vorhanden.

E. coli waren in beiden Versuchsdurchgängen ab der sechsten Woche nicht mehr nachweisbar. Ebenfalls nach fünf Wochen bzw. nach sechs Wochen waren *S. Typhimurium* nicht mehr zu detektieren (Abbildung 14). Die D-Werte lagen in einem der Milchviehanlage I vergleichbaren Bereich.

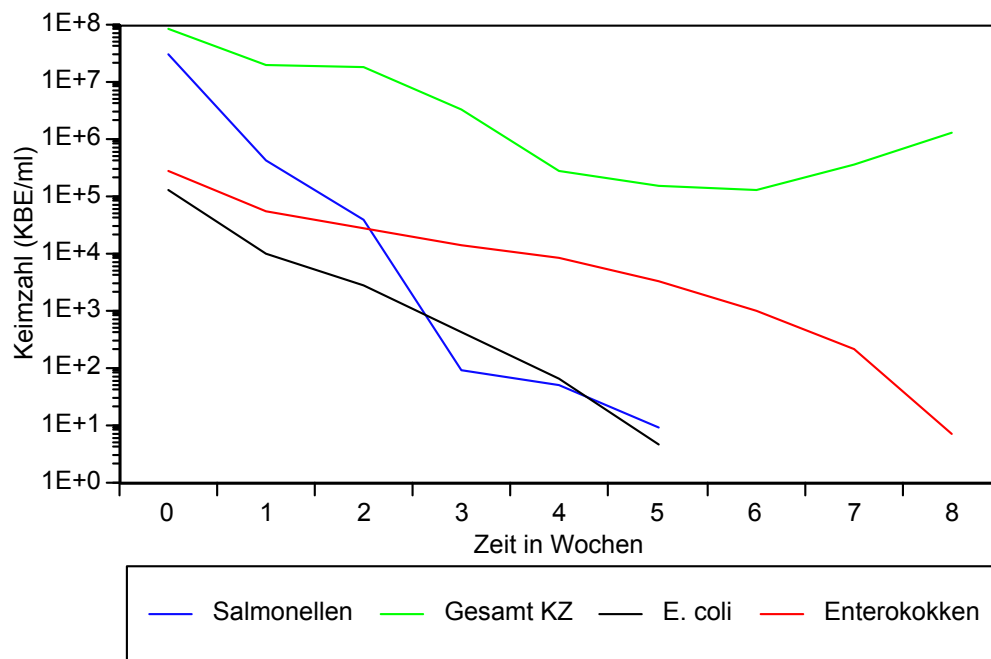


Abbildung 14: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen von bei 22°C gelagerter Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

4.8 Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 37°C gelagerten Gülle nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Bei einer Lagerungstemperatur des Rinderflüssigmistes bei 37°C war nach 16 bzw. 18 Tagen Versuchsdauer keine Reduktion der Gesamtkeimzahl zu verzeichnen (Anhang: Tabelle 26 a/b). Zwar war es von einem anfänglichen Keimgehalt von 10^8 KBE/ml zu einer Reduzierung auf 10^5 KBE/ml um den sechsten Tag gekommen, danach stieg die GKZ in beiden Versuchsdurchgängen wieder bis auf die Ausgangswerte an.

Die Enterokokken verhielten sich in beiden Durchgängen deutlich unterschiedlich. Während sich im ersten Durchgang der Keimgehalt entsprechend der GKZ verhielt und nach einem zwischenzeitlichen Abfall einen deutlichen Wiederanstieg zeigte, war in der Versuchswiederholung eine kontinuierliche Abnahme des Gehaltes an Enterokokken zu verzeichnen.

Auch bei einer Lagerungstemperatur von 37°C starben *E. coli* und *S. Typhimurium* ab. Nach sechs Tagen konnten keine *E. coli*, nach zehn bzw. zwölf Tagen keine *S. Typhimurium* nachgewiesen werden (Abbildung 15). Die rapide Salmonellenreduktion zeigte sich auch anhand der D-Werte: jeden Tag reduzierte sich die Zahl der Salmonellen um 0,633 bzw. 0,721 Zehnerpotenzen.

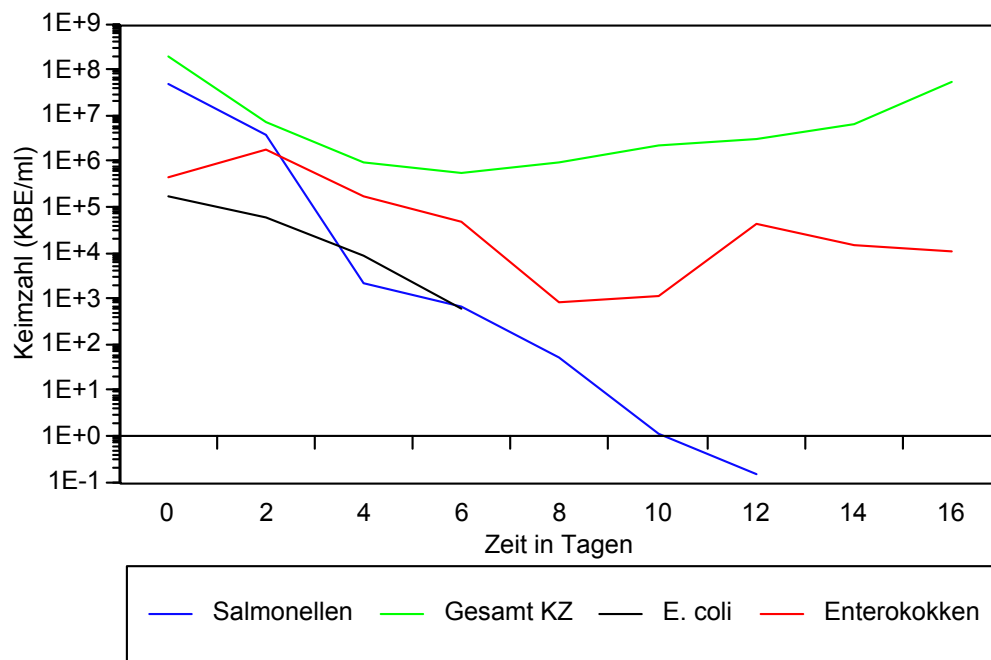


Abbildung 15: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 37°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

4.9 Überlebensfähigkeit von *S. Typhimurium* DT104 in bei 22°C gelagertem Rinderflüssigmist der Milchviehanlage I

Bei der Auswertung von drei wiederholenden Versuchsansätzen zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit von *S. Typhimurium* in bei 22°C gelagertem Rinderflüssigmist zeigte sich in allen drei Durchgängen ein übereinstimmendes Verhalten (Anhang: Tabelle 27). Innerhalb der ersten Lagerungswoche im ersten Durchgang bzw. bis zum 10. Tag in den beiden Wiederholungen war bereits eine Reduktion des Keimgehaltes um zwei Zehnerpotenzen zu verzeich-

nen, die im weiteren Verlauf kontinuierlich fortschritt, bis keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden konnten (Abbildung 16). Die Nachweisgrenze wurde im ersten und dritten Versuchsdurchgang nach sechs Wochen, im zweiten Durchgang nach acht Wochen unterschritten. Die D-Werte der drei Versuche betrugen 0,162, 0,142 und 0,188 Zehnerpotenzen/d.

Der gleichzeitig bestimmte prozentuale Trockensubstanzgehalt fiel während der Versuchsdauer kontinuierlich ab (Anhang: Tabelle 27). Im ersten und dritten Versuchsdurchgang kam es zu einer Reduktion von 9,82% auf 8,45% bzw. 8,75% auf 7,97%. Im zweiten Versuchsdurchgang reduzierte sich der Trockensubstanzgehalt ebenfalls - von 11,41% auf 10,20% -, jedoch überschritt er während der gesamten Versuchsdauer denjenigen der übrigen Versuche und fiel auch am Ende nicht unter 10%.

In allen drei Durchgängen fiel der pH-Wert von anfänglich neutralen bis leicht basischen Werten in das saure Milieu und rangierte zum Ende der Versuche zwischen 6,28 und 6,52.

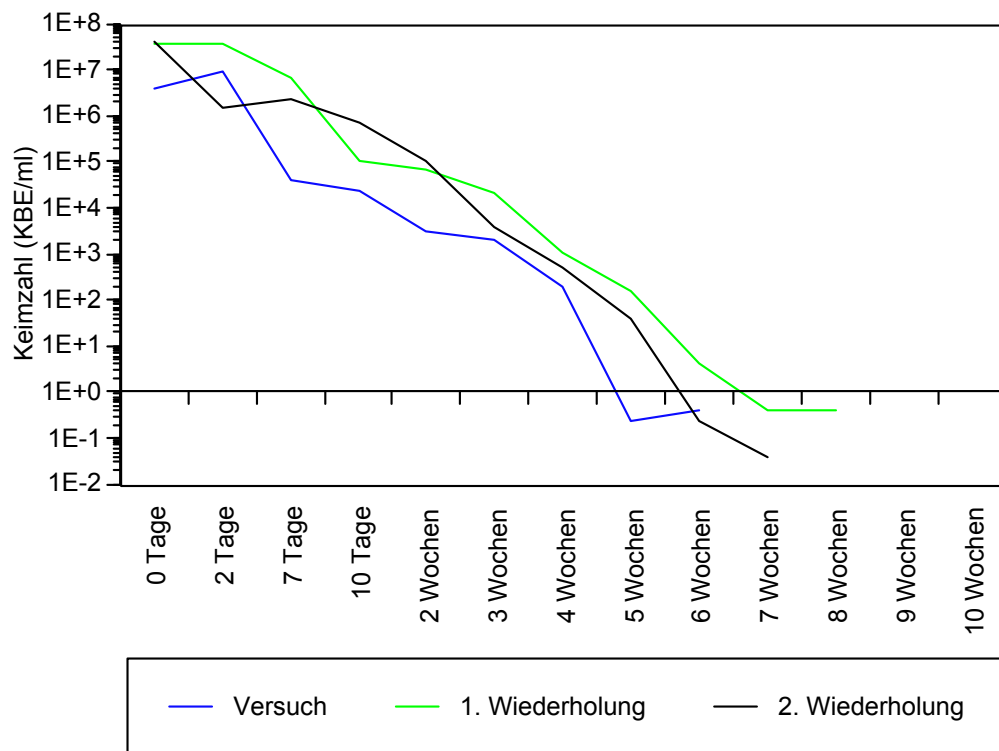


Abbildung 16: Überlebenszeiten von *S. Typhimurium* DT104 in der bei 22°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage I

4.10 Überlebensfähigkeit von *S. Typhimurium* DT104 in bei 37°C gelagertem Rinderflüssigmist der Milchviehanlage I

In Ergänzung zu Kap. 4.3 wurde eine weitere Versuchsreihe mit einem verlängerten Auswertungszeitraum erforderlich. Die Lagerung von Gülle bei 37°C zeigte, dass *S. Typhimurium* bereits nach sechs bzw. acht und zehn Tagen nicht nachzuweisen war (Abbildung 17). Im ersten Versuchsdurchgang kam es zu einem drastischen Rückgang der Keimzahl um fünf Zehnerpotenzen zwischen dem vierten und sechsten Tag, während in den beiden Wiederholungen die Keimreduktion eher kontinuierlich vonstatten ging. Die sehr hohen D-Werte von 0,839 bis 0,978 belegen, dass sich über den gesamten Versuchsverlauf die Keimzahl täglich um knapp eine Zehnerpotenz reduzierte (Anhang: Tabelle 28). Der Trockensubstanzgehalt senkte sich während der zwölfwöchigen Versuchsdauer in allen drei Versuchen um etwa zwei Prozent.

Abweichend von einer Lagerung der Gülle bei 22°C trat bei einer Lagerungstemperatur von 37°C keine Ansäuerung des Substrates ein. Im Gegenteil kam es im ersten Versuchsdurchgang zu einer deutlichen Alkalisierung mit einem Maximalwert von pH 8,00 am sechsten Tag. In den beiden Wiederholungen waren diese pH-Veränderungen nicht so stark ausgeprägt, jedoch lag auch hier der pH mit Werten um 7,5 im alkalischen Milieu.

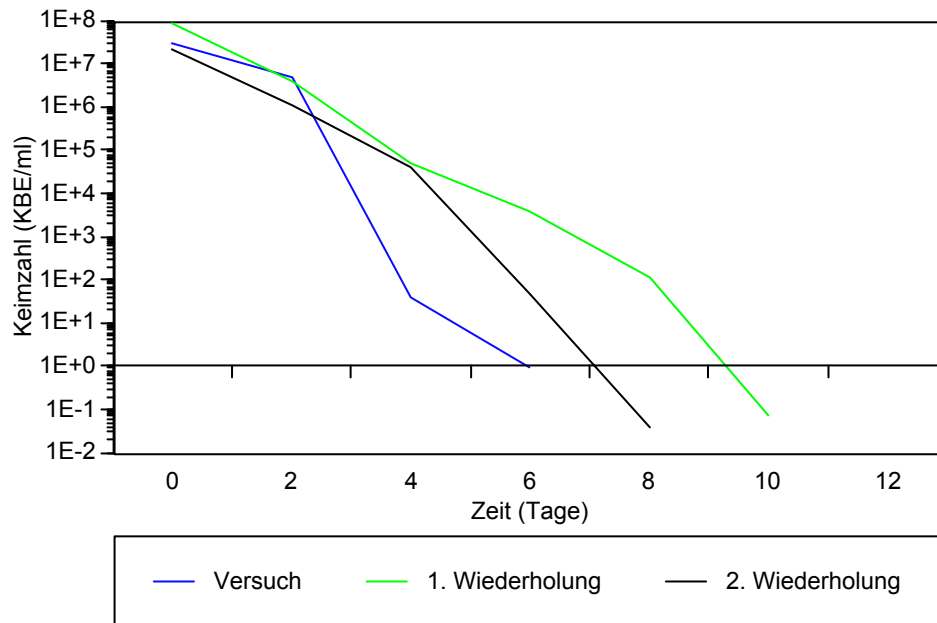


Abbildung 17: Überlebenszeiten von *S. Typhimurium* DT104 in der bei 37°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage I

4.11 Überlebensraten von *S. Typhimurium* DT104 in geschlossenen Behältnissen bei einer Lagerungstemperatur von 37°C

Bei der Lagerung einer Suspension von *S. Typhimurium* DT104 in geschlossenen Ampullen bei 37°C zeigte sich in drei wiederholenden Versuchen eine hohe Übereinstimmung (Abbildung 18, Anhang: Tabelle 29). Auch beim Abbruch der Versuche nach 65 Wochen Lagerung überlebten noch Salmonellen in der Suspension.

Die Ausgangskeimgehalte von 10^8 - 10^9 KBG/ml reduzierten sich während der ersten zwei bis drei Wochen zunächst rasch um etwa zwei Zehnerpotenzen.

Anschliessend erfolgte kontinuierlich eine weitere, allerdings langsamer fortschreitende Reduktion der *S. Typhimurium* -Keimzahlen, bis nach Abschluss der Versuche in der jeweils 65. Lagerungswoche Keimgehalte von 10^3 bis 10^4 KBE/ml erreicht waren. Diese allmähliche Reduzierung drückte sich in niedrigen D-Werten aus. Die Salmonellenanzahl reduzierte sich täglich um 0,01 Zehnerpotenzen.

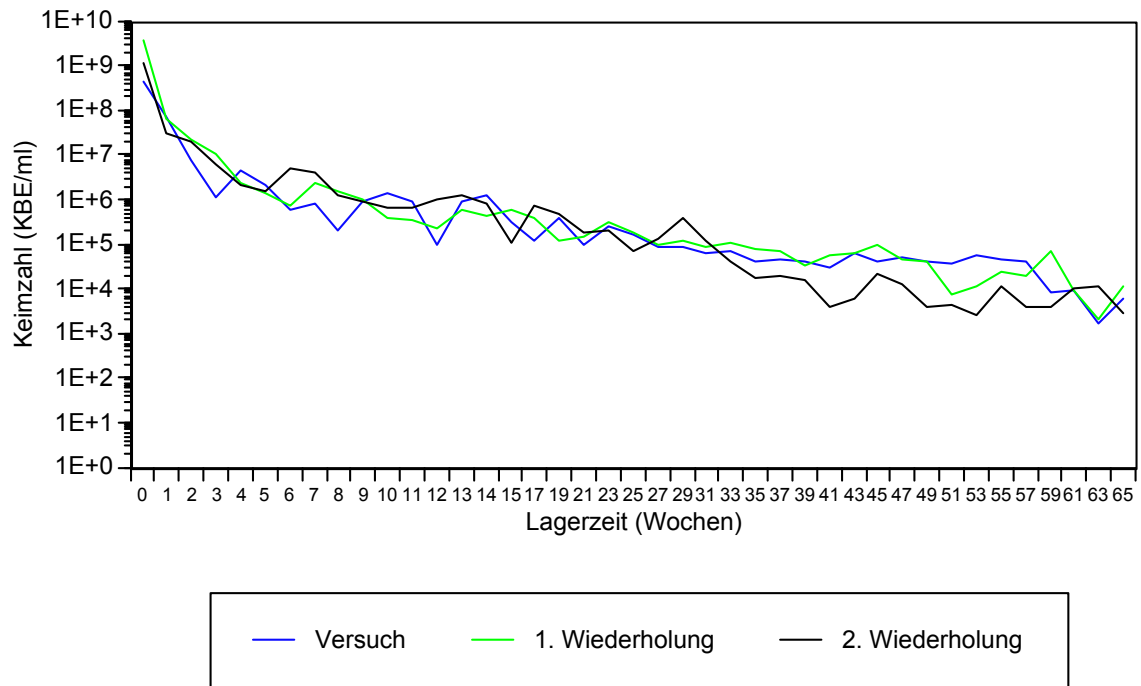


Abbildung 18: Überleben von *S. Typhimurium* DT104 in geschlossenen Behältnissen in Rindergülle bei einer Lagerungstemperatur von 37°C

4.12 Inaktivierung von *S. Typhimurium* DT104 nach Zusatz einzelner organischer Säuren

4.12.1 Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration organischer Säuren gegen *S. Typhimurium* DT104

Die Zugabe von Ameisensäure übte erst in hoher Konzentration eine abtötende Wirkung auf *S. Typhimurium* aus. In aufsteigenden Konzentrationen von 0,625 g/l, 1,25 g/l, 2,5 g/l, 5g/l und 10g/l waren auch nach 18tägiger Lage-

rung noch Salmonellen nachweisbar. Erst nach viertägiger Einwirkungsdauer von 20 g/l Ameisensäure konnten keine Salmonellen aufgefunden werden (Anhang: Tabelle 30).

Auch Essigsäure zeigte erst in hohen Konzentrationen eine Salmonellen-abtötende Wirkung. Bei der Zugabe von 40 g/l waren die Salmonellen nach sechs Tagen, bei 80 g/l nach zwei Tagen abgestorben (Anhang: Tabelle 31).

Die Methode der Überprüfung der minimalen Hemmkonzentrationen zeigte erst bei zweitägiger Einwirkung von 40 g/l Propionsäure eine keimabtötende Wirkung auf *S. Typhimurium* (Anhang: Tabelle 32).

Buttersäure übte bereits in einer Konzentration von 20g/l eine keimabtötende Wirkung aus: nach zehn Tagen waren keine Salmonellen nachweisbar. In höheren Konzentrationen war eine Hemmung des Keimwachstums eher zu beobachten: bei 40 g/l nach vier Tagen und bei 80 g/l nach zwei Tagen (Anhang: Tabelle 33).

Die Isobuttersäure zeigte ein ähnliches Abtötungsmuster wie Buttersäure. Nach 16tägiger Wirkungsdauer von 20 g/l, nach viertägiger Einwirkung von 40g/l und nach zweitägiger Wirkungsdauer von 80 g/l konnten keine *S. Typhimurium* nachgewiesen werden (Anhang: Tabelle 34).

Die Zugabe von Valeriansäure übte eine besonders starke abtötende Wirkung auf *S. Typhimurium* aus. 10 g/l vermochten das Wachstum nach 18 Tagen, 20 g/l nach vier Tagen und 40 g/l nach einem Tag zu stoppen. Nach Zufügen von 80 g/l wurden sogar innerhalb von zwei Stunden keine Salmonellen nachgewiesen (Anhang: Tabelle 35).

Die Isovaleriansäure entsprach in ihrer Wirksamkeit der Valeriansäure. Nach 16 Tagen war unter Einwirkung von 20 g/l kein Salmonellenwachstum vorhanden. Bei 40 g/l dauerte die Abtötung der Salmonellen zwei Tage und bei 80 g/l einen Tag (Anhang: Tabelle 36).

Milchsäure entfaltete ebenfalls in höheren Konzentrationen eine deutliche Salmonellen-abtötende Wirkung. Bei 20 g/l konnten nach 14 Tagen, bei 40 g/l

nach acht Tagen und bei 80 g/l nach vier Tagen keine *S. Typhimurium* nachgewiesen werden (Anhang: Tabelle 37).

4.12.2 Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 bei verschiedenen Säurekonzentrationen

Mit 40 g/l und 60 g/l Essigsäure konnte täglich eine Reduzierung um jeweils eine halbe Zehnerpotenz erreicht werden (D-Werte: 0,504 bzw. 0,474, Anhang: Tabelle 38a). Die Zugabe von 10 g/l Essigsäure förderte das Salmonellenwachstum sogar. Während der zweiten Lagerungswoche war der Keimgehalt vorübergehend um eine Zehnerpotenz angestiegen (Abbildung 19). Dieses Verhalten zeigte sich an dem negativen D-Wert (-0,086).

In einer Wiederholung dieses Versuchs mit gleicher Methodik zeigten hohe Essigsäure-Konzentrationen die gleiche Auswirkung wie im ersten Versuch (Anhang: Tabelle 38b). Sowohl bei Zugabe von 10 g/l als auch 15 g/l zeigte sich nach einer Woche ein transienter Peak, der jedoch nicht ausreichend war, um eine Förderung des Keimwachstums im D-Wert auszudrücken. Mit 0,050 bzw. 0,067 spiegelten die D-Werte über die gesamte Versuchsdauer eine leicht keimreduzierende Wirkung wider.

In ähnlicher Weise wie bereits bei Essigsäure beobachtet, trat auch bei Zugabe von 20 g/l Propionsäure eine Förderung des Keimwachstums auf (Abbildung 20). Bis zum siebten Tag wurde bei dieser Konzentration eine Reduzierung des Keimgehaltes um zwei Zehnerpotenzen erzielt, anschliessend stieg die Salmonellenanzahl innerhalb der zweiten Woche wieder um Zehnerpotenzen an, um bis zum Ende des Versuchs auf diesem Level zu verbleiben. Die fehlende Keimabtötung durch Propionsäure bei einer Konzentration von 20g/l drückt sich in dem negativen D-Wert von -0,269 aus (Anhang: Tabelle 40).

Bei geringen Konzentrationen Buttersäure trat keine Salmonellen-fördernde Wirkung auf. Die Werte zeigen eine kontinuierliche Zunahme der Keimreduktion mit steigenden Konzentrationen (Abbildung 21, Anhang: Tabelle 41).

Auch geringe Konzentrationen an Valeriansäure entfalteten eine keimreduzierende Wirkung (Abbildung 22). So betrugen die D-Werte von 1,25 g/l 0,088, von 2,5g/l 0,067 und von 5g/l 0,166 (Anhang: Tabelle 42).

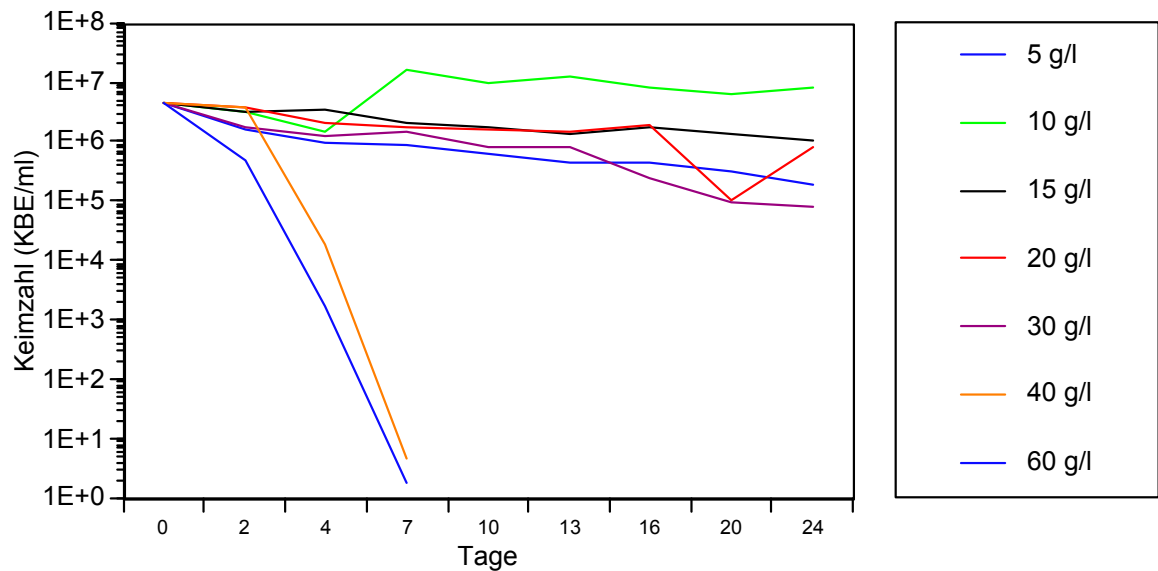


Abbildung 19: Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) durch verschiedene Essigsäurekonzentrationen

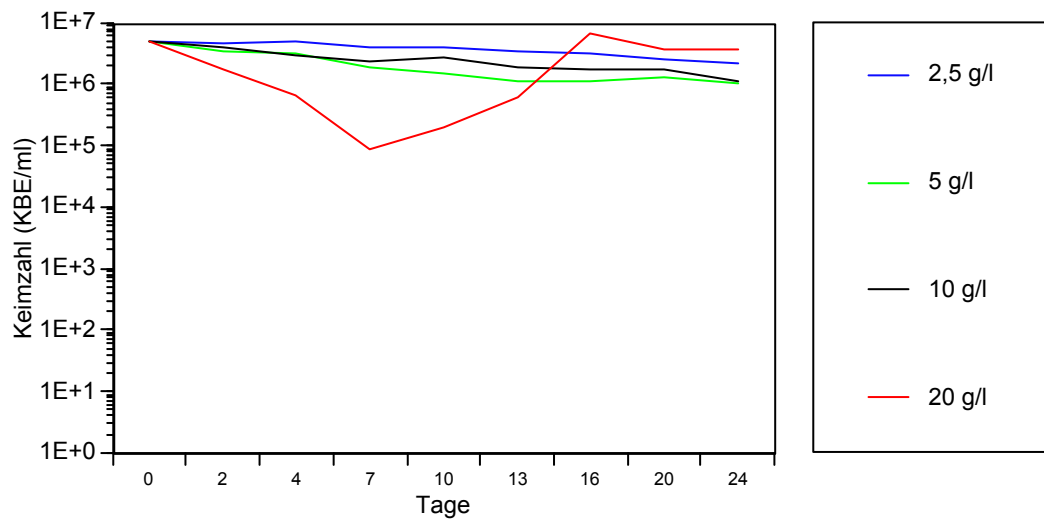


Abbildung 20: Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) durch verschiedene Propionsäurekonzentrationen

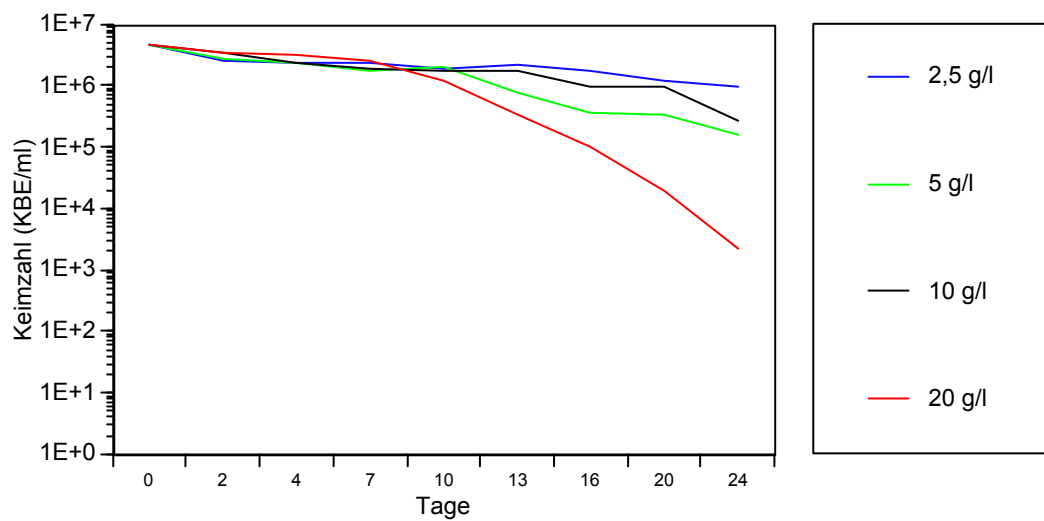


Abbildung 21: Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) durch verschiedene Buttersäurekonzentrationen

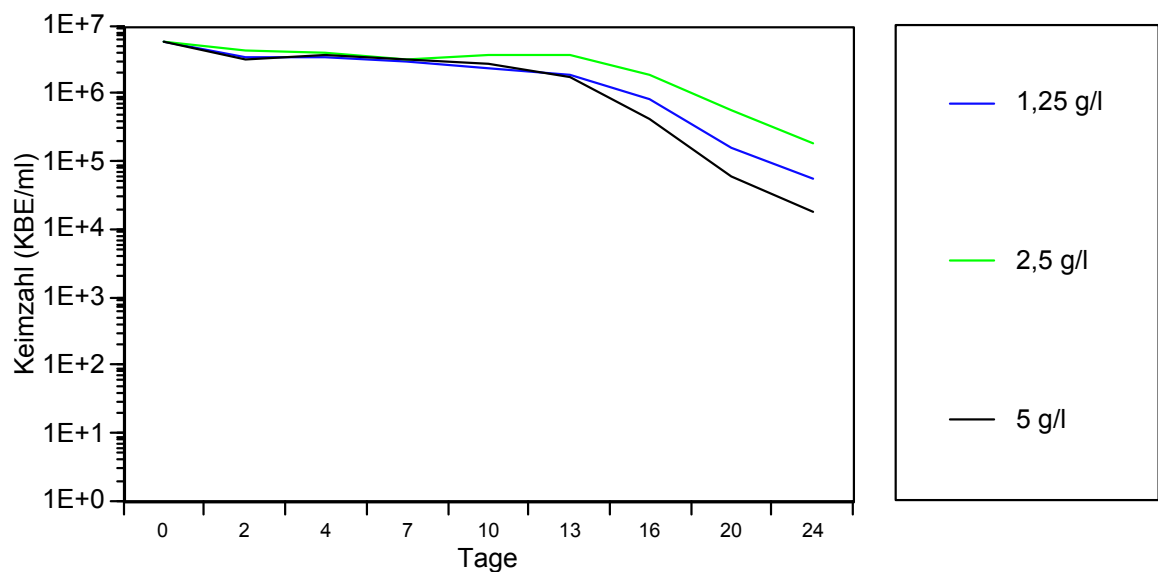


Abbildung 22: Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) durch verschiedene Valerianäurekonzentrationen

4.13 Überleben von *S. Typhimurium* DT104 nach Zugabe zu einem Säuregemisch

Aufgrund der beobachteten Ergebnisse nach Zugabe verschiedener einzelner Säuren wurde abschliessend ein Gemisch aus diesen Säuren hergestellt und getestet (s. Kap. 3.2.6.3).

Dieses Säuregemisch zeigte in drei übereinstimmenden Versuchsdurchgängen eine Salmonellen-abtötende Wirkung (Abbildung 23). Von Ausgangskonzentrationen im Bereich von 10^6 KBE/ml *S. Typhimurium* wurden nach 14 bis 16 Tagen keine Salmonellen nachgewiesen. Die D-Werte belegen, dass es nach Einwirkung des verwendeten Säuregemischs innerhalb eines Tages zu einer Reduktion des Salmonellengehaltes um durchschnittlich 0,5 Zehnerpotenzen kam (Tabelle 14).

Tabelle 14: Überleben von *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) nach Zusatz zu einem Säuregemisch

Zeit (Tage)	Versuchsdurchgang 1	Versuchsdurchgang 2	Versuchsdurchgang 3
0	6,40E+06	6,40E+06	6,40E+06
1	3,60E+06	3,50E+06	4,30E+06
2	2,60E+06	2,30E+06	2,80E+06
3	2,70E+06	2,20E+06	1,20E+06
4	6,90E+05	1,20E+06	9,10E+05
5	4,90E+05	9,10E+04	7,90E+05
6	5,90E+03	6,10E+04	8,80E+04
7	3,50E+03	2,90E+04	1,20E+04
8	1,00E+03	1,90E+04	1,10E+04
9	7,50E+02	1,40E+04	6,20E+03
10	1,40E+02	4,50E+02	3,70E+02
12	7,50E+01	2,20E+02	1,60E+02
14	1,00E+01	5,30E+01	2,70E+01
16	n.n.	4,50E+00	9,00E+00
18	n.n.	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Salmonellen	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Versuch 1	0,507	0,461-0,563
Versuch 2	0,443	0,404-0,492
Versuch 3	0,449	0,410-0,496

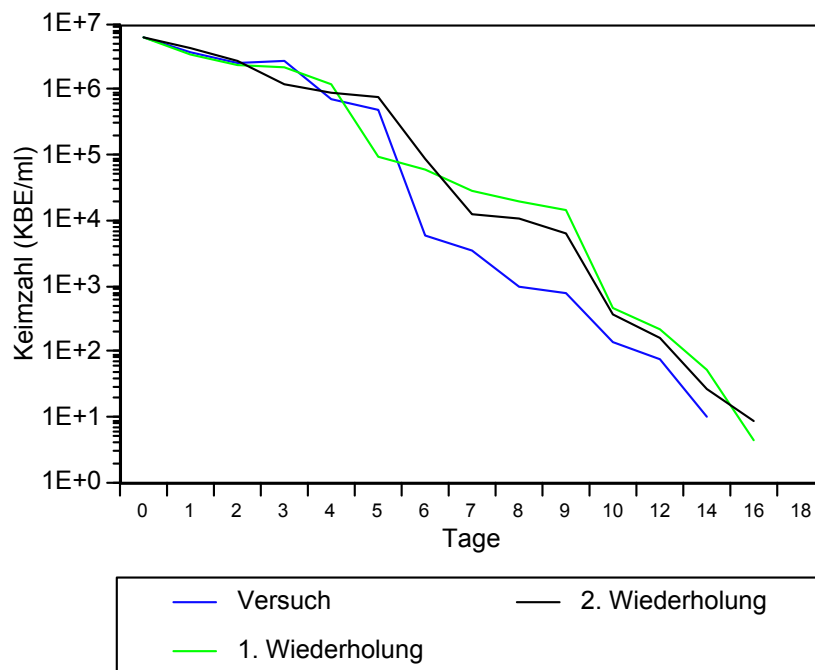


Abbildung 23: Überleben von *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) nach Zusatz zu einem Säuregemisch

4.14 Untersuchungen auf Auxotrophie einiger isolierter Salmonellen

Es wurde geprüft, ob die Auxotrophie der 17 Isolate des Impfstammes BT: a während der Passage durch eine mesophile Biogasanlage erhalten bleibt oder eventuell eine Rückmutation in Richtung pathogener Salmonellen aufgetreten war.

Auf dem Bovisaloral-Diagnostikum® müsste ein Wildstamm nach Angaben des Herstellers ein normales Wachstum zeigen, während attenuierte Impfstämme „pin-point“-Kolonien ausbilden. Wir verwendeten für unsere Untersuchungen MUELLER-HINTON-Minimalmedium und beobachteten bei den Isolat des Zoosaloral® -Impfstammes nach einer Verweildauer von durchschnittlich 24 Tagen in der Biogasanlage ein auxotrophes Wachstum, d. h. der Impfstamm ist gemessen an den Mitteilungen des Impfstoffproduzenten auch nach Passage durch die Biogasanlage als apathogen einzustufen. In der Abbildung 24 ist das auxotrophe Wachstum des Impfstammes im Vergleich zu *S. Typhimurium* DT104 zu sehen.

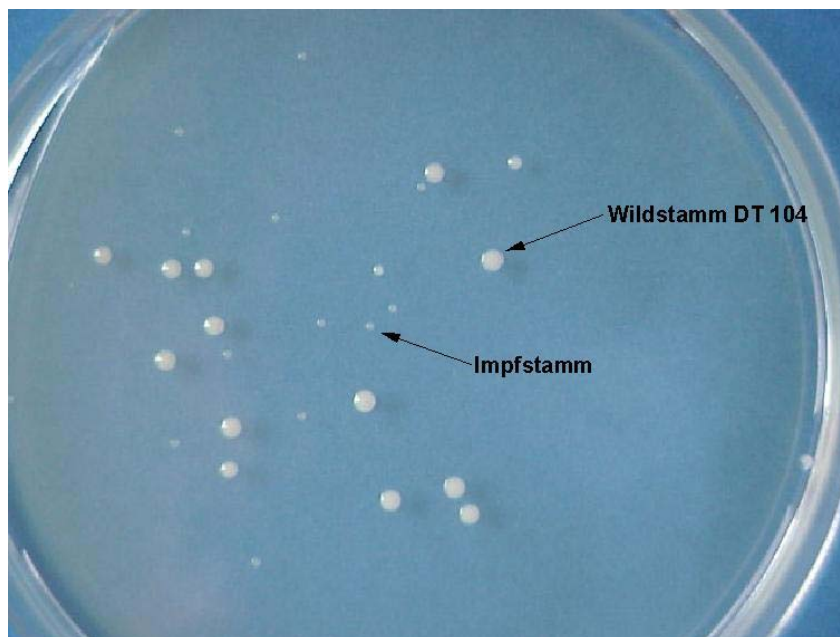


Abbildung 24: *S. Typhimurium* DT104 wächst auf MUELLER-HINTON-Medium Salmonellen-typisch, der zum Vergleich aufgebrachte Zoosaloral®-Impfstamm bildet kleine „pin-point“-Kolonien aus

4.15 Antibiotikaresistenz und –empfindlichkeit ausgewählter Salmonellenisolate

Insgesamt wurden aus dem Untersuchungsgut der Dissertation 18 Isolate der Salmonellen-Wildstämme, 17 Isolate der Zoosaloral-Impfstämme® und der Isolate aus dem Zoosaloral®-Lebendimpfstoff für Kälber isoliert (vgl. Tabelle 10) und auf ihre Antibiotikaresistenz getestet (Tabelle 15).

Alle drei *S. Agona* -Isolate waren resistent gegen Spectinomycin, Erythromycin und Penicillin, eines hiervon zusätzlich gegen Tetrazyklin. Die beiden *S. Anatum*-Isolate zeigten übereinstimmend eine Spectinomycin-Erythromycin-Resistenz und zusätzlich ein intermediäres Verhalten in Bezug auf Penicillin. Bei vier *S. Derby*-Isolaten bestand eine Spectinomycin-Erythromycin-Penicillin-Resistenz. Zusätzlich trat eine intermediäre Reaktion gegenüber jeweils zwei bis drei weiteren Antibiotika auf, unter ihnen befand sich in jedem Fall Tetrazyklin.

Jeweils einmal wurde *S. Hadar* und *S. Havana* isoliert. *S. Hadar* war resistent gegen Streptomycin, Spectinomycin, Tetrazyklin, Erythromycin und Penicillin, zeigte ein intermediäres Verhalten gegen Gentamycin und Neomycin. *S. Havana* reagierte resistent gegenüber Spectinomycin und Erythromycin und intermediär gegenüber Tetrazyklin und Penicillin.

Bei vier *S. Tennessee*-Isolaten zeigten sich zahlreiche Abweichungen. Übereinstimmend war die Resistenz gegen Spectinomycin, Erythromycin und Penicillin (in einem Fall gegen Penicillin nur intermediär). Ein Isolat war zusätzlich resistent gegenüber Sulfonamiden und Ampicillin. Auch intermediäre Reaktionen waren gegen bis zu fünf weitere Antibiotika zu verzeichnen.

Unter drei *S. Typhimurium* -Wildstämmen wurde einmal der Phagentyp DT104 isoliert. Dieser war gegen fünf Antibiotika resistent: Streptomycin, Sulfonamide, Spectinomycin, Erythromycin und Penicillin. Einer der beiden übrigen *S. Typhimurium* -Wildstämme wuchs zusätzlich auch in Gegenwart von Ampicillin und Tetrazyklin und zeigte ein intermediäres Verhalten gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure und Neomycin. Der andere Wildstamm war nur gegen Spectinomycin, Erythromycin und Penicillin resistent.

Alle 17 Isolate des *S. Typhimurium*-Impfstammes BT: a waren resistent gegenüber Spectinomycin, Erythromycin und Penicillin. Außerdem waren drei Isolate zusätzlich resistent gegen Sulfonamide. Ein intermediäres Verhalten trat zweimal gegen Sulfonamide und viermal gegen Neomycin auf. Ein weiteres Zoosaloral®-Isolat reagierte intermediär gegenüber Sulfonamiden und Gentamycin. Alle drei Isolate des Zoosaloral®-Impfstammes (Lebendimpfstoff für Kälber) zeigten außer der Spectinomycin-Erythromycin-Penicillin-Resistenz ein intermediäres Verhalten gegen Sulfonamiden und Neomycin.

Tabelle 15: Ergebnisse der Antibiogramme ausgewählter isolierter Salmonellen

Nr.	Salmonellen mit Typisierergebnis	Reaktion auf Antibiotika															Agar
		AK 30	AMC 30	AMP 10	S 25	SXT 25	S3 300	SH 10	C 30	TE 30	E 15	CN 10	CXM 30	N 10	ENR 5	P 10	
7	<i>S. Agona</i> 4,12:f,g,s:-	s	s	s	s	s	s	r	s	r	r	s	s	s	s	r	MH/ISO
11	<i>S. Agona</i> 4,12:f,g,s:-	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	MH/ISO
14	<i>S. Agona</i> 4,12:f,g,s:-	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	MH/ISO
31	<i>S. Anatum</i> 3,10:e,h:1,6	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	i	MH
32	<i>S. Anatum</i> 3,10:e,h:1,6	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	i	MH
17	<i>S. Derby</i> 1,4,12:f,g:-	s	s	s	s	s	s	r	s	i	r	s	s	i	s	r	MH/ISO
22	<i>S. Derby</i> 1,4,12:f,g:-	s	s	s	i	s	s	r	s	i	r	s	s	s	s	r	MH/ISO
23	<i>S. Derby</i> 1,4,12:f,g:-	s	i	s	i	s	s	r	s	i	r	s	s	s	s	r	MH/ISO
10	<i>S. Derby</i> 4,12:f,g:-	s	s	s	s	s	s	r	s	i	r	i	s	s	s	r	MH/ISO
1	<i>S. Hadar</i> 6,8:z10:e,n,x	s	s	s	r	s	s	r	s	r	r	i	s	i	s	r	MH/ISO
33	<i>S. Havana</i> 13,23:f,g:-	s	s	s	s	s	s	r	s	i	r	s	s	s	s	i	MH
2	<i>S. Tennessee</i> 6,7:z29:-	s	i	s	i	s	s	r	s	s	r	i	s	i	i	r	MH/ISO
34	<i>S. Tennessee</i> 6,7:z29:-	s	s	s	s	s	s	r	s	i	r	s	s	s	s	r	MH
37	<i>S. Tennessee</i> 6,7:z29:-	s	s	r	s	s	r	r	s	s	r	s	s	s	s	i	MH
38	<i>S. Tennessee</i> 6,7:z29:-	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	MH
5	<i>S. Typhimurium</i> , LT: DT120, BT:a	s	i	r	r	s	r	r	s	r	r	s	s	i	s	r	MH/ISO
24	<i>S. Typhimurium</i> , 4,5,12: i. 1,2 LT: DT104/BT:a	s	s	s	r	s	r	r	s	s	r	s	s	s	s	r	MH/ISO
30	<i>S. Typhimurium</i> , 4,5,12: i. 1,2 LT:ut/BT:b	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO

(Fortsetzung folgt)

Tabelle 15: (Fortsetzung)

Nr.		Salmonellen mit Typisiererergebnis	Reaktion auf Antibiotika															Agar
			AK 30	AMC 30	AMP 10	S 25	SXT 25	S3 300	SH 10	C 30	TE 30	E 15	CN 10	CXM 30	N 10	ENR 5	P 10	
3		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	i	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
4		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	i	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
6		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	r	r	s	s	r	s	s	i	s	r	ISO
8		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	r	r	s	s	r	s	s	i	s	r	ISO
9		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
12		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	i	s	r	ISO
13		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
15		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
16		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
18		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
19		<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO

(Fortsetzung folgt)

Tabelle 15: (Fortsetzung)

Nr.	Salmonellen mit Typisierergebnis	Reaktion auf Antibiotika															Agar
		AK 30	AMC 30	AMP 10	S 25	SXT 25	S3 300	SH 10	C 30	TE 30	E 15	CN 10	CXM 30	N 10	ENR 5	P 10	
20	<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	r	r	s	s	r	s	s	i	s	r	ISO
21	<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
25	<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	i	r	s	s	r	i	s	s	s	r	ISO
29	<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009, Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
35	<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009 Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
36	<i>S. Typhimurium</i> , LT:DT009 Zoosaloral®-Impfstamm, BT: a	s	s	s	s	s	s	r	s	s	r	s	s	s	s	r	ISO
26	<i>S. Typhimurium</i> , Zoosal- oral R®-Impfstamm, (Le- bendimpfstoff für Kälber)	s	s	s	s	s	i	r	s	s	r	s	s	i	s	r	ISO
27	<i>S. Typhimurium</i> , Zoosal- oral R®-Impfstamm, (Le- bendimpfstoff für Kälber)	s	s	s	s	s	i	r	s	s	r	s	s	i	s	r	ISO
28	<i>S. Typhimurium</i> , Zoosal- oral R®-Impfstamm, (Le- bendimpfstoff für Kälber)	s	s	s	s	s	i	r	s	s	r	s	s	i	s	r	ISO
39	<i>Staph. aureus</i> ATCC 25923*	25(21-26)		41(32-41)					28(23-29)	30(25-31)	31(26-34)	25(24-33)				42(35-45)	MH

r = resistent, i = intermediär, s = sensibel; AK30=Amikacin, AMC30=Amoxicillin/ Clavulan, AMP10=Ampicillin, S25=Streptomycin, SXT25=Sulfamethoxazol/Trimethoprim, S3 300= Sulfonamide, SH10=Spectinomycin, C30=Chloramphenicol, E30=Tetrazyklin, E15=Erythromycin, CN10=Gentamycin, N10=Neomycin, ENR5=Enrofloxacin, P10=Penicillin G; MH = MUELLER-HINTON-Agar, ISO = ISO-Sensi-Disc®-II-Agar, * *Staph. aureus* wurde zum Vergleich getestet, Zahlenangaben: gemessener Hemmhofdurchmesser in mm (in Klammern: laut DIN geforderter Hemmhofdurchmesser)

5 Diskussion

Im Jahr 1996 wurde in einer Milchviehanlage in Oberlungwitz/Sachsen (hier bezeichnet als „Milchviehanlage I“) Salmonellose, hervorgerufen durch *S. Typhimurium*, amtlich festgestellt und im Rahmen der angeordneten Bekämpfungsmaßnahmen anschließend eine regelmäßige Impfung der Kälber mit dem Lebendimpfstoff Zoosaloral[®] durchgeführt.

Die Serovar *S. Typhimurium* DT104 tritt seit etwa zehn Jahren in Europa – vor allem in Großbritannien, aber auch in Deutschland – gehäuft auf und ist auf dem Weg, den bislang vorherrschenden Salmonelloseerreger *S. Enteritidis* PT4 als dominierenden Epidemietyp abzulösen (KÜHN und TSCHÄPE 1995; LIESEGANG et al. 1997; Robert-Koch-Institut 1998; THRENLFAL et al. 1996). Das auffälligste Charakteristikum der Serovar *S. Typhimurium* DT104 ist eine Mehrfachresistenz gegenüber Antibiotika, die bei 90% aller Isolate auftritt (GERICKE et al. 1999; HOSEK et al. 1997). Der Stamm wurde zunächst ausschließlich vom Rind isoliert, danach zusätzlich in Lebensmitteln sowie in Probenmaterial von Menschen und Schweinen. Mit einer Häufung des Vorkommens beim Rind und schließlich beim Schwein unterscheidet sich *S. Typhimurium* DT104 deutlich von *S. Enteritidis* PT4, für die als Reservoir das Huhn und das Ei anzusehen sind (LIESEGANG et al. 1997).

Es ist bekannt, dass von tierischen Ausscheidungen wie Dung, Gülle und Jauche Infektionsrisiken ausgehen (STRAUCH 1988). STRAUCH (1988) schätzt ein, dass der Dung von größeren Tierhaltungsbetrieben generell als infiziert anzusehen ist und nur unter Beachtung bestimmter Sicherheitsvorschriften verwertet werden darf. Aus diesem Grund wird angestrebt, dieses infektiöse Potential soweit wie möglich zu verringern. Voraussetzung hierfür ist es, eine Entscheidung über eine „annehbare Endkonzentration“ des jeweiligen Erregers zu treffen. Bei Salmonellen gilt es beispielsweise als ausreichend, wenn selbst bei Anwendung optimaler Anreicherungsverfahren in 10 ml Gülle keine Salmonellen mehr qualitativ nachweisbar sind (STRAUCH 1988). Jedoch steht die endgültige Definition einer „seuchenhygienisch unbedenklichen Gülle“ noch aus und weitergehende Untersuchungen sollen dazu beitragen, das Infektionsrisiko durch tierische Ausscheidungen zu minimieren.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation interessierten daher zunächst die Fragen, wie lange Salmonellen in nativem Rinderflüssigmist überleben, und ob Salmonellen unter natürlichen Bedingungen während der mesophilen anaeroben Fermentation in der Biogasanlage der Milchviehanlage I inaktiviert werden.

GRUNWALD (1995) hatte im Laborversuch nachgewiesen, dass Salmonellen unter den Bedingungen der anaeroben mesophilen Fermentation nach sechs bzw. acht Tagen inaktiviert werden. Die Salmonellose bzw. anschließende Impfung mit Lebendvakzine in der Milchviehanlage I in Oberlungwitz/Sachsen mit angeschlossener mesophiler Biogasanlage bot die Gelegenheit zur Untersuchung, ob dies auch unter natürlichen Verhältnissen der Fall ist.

Wir entnahmen in den Jahren 1997-2000 Proben aus der Rindergülle der Milchviehanlage I, den Fermentern und der Lagune sowie den Fettabscheidern der mesophil arbeitenden Biogasanlage. Bei der hygienisch-mikrobiologischen Untersuchung waren 21 von 22 (95,5%) Proben der Rindergülle Salmonellenpositiv, im Fermenter I 69,2%, im Fermenter II 50,0%, in der Lagune 77,3% und im Fettabscheider 40,0%. Insgesamt wurden zwölf verschiedene Salmonellen-Serovare isoliert. Im ersten Fermenter waren die Serovare *S. Typhimurium*, *S. Montevideo*, *S. Derby*, *S. Hadar*, *S. Anatum* und *S. Agona* nachweisbar, im zweiten Fermenter *S. Typhimurium* und *S. Agona* und in der Lagune *S. Typhimurium*, davon einmal der epidemiologisch wichtige Stamm DT104, sowie *S. Agona*, *S. Hadar* und *S. Mbandaka*.

Wie die Untersuchungen gezeigt haben, gelangten aus der Milchviehanlage I nur *S. Typhimurium* LT: DT 009 des Zoosaloral®-Impfstammes (bei allen Untersuchungen) bzw. *S. Typhimurium* LT: ut/BT: b (bei der Untersuchung am 17.1.2000, vgl. Tabelle 10) in den Fermenter, so dass sich die Frage nach der Herkunft der zahlreichen zusätzlich nachgewiesenen Salmonellen-Serovare stellt. Beispielsweise wurde am 17.01.2000 in den Fettabscheiderinhalten und im Fermenter II *S. Tennessee* isoliert, was einen Hinweis auf eine unzureichende Hygienisierung durch die eingesetzte Hitzevorbehandlung gibt. Es wäre aber auch denkbar, dass einzelne Salmonellen-Serovare eine Toleranz in dem jeweiligen Milieu entwickelt haben. Hierauf deuten Häufungen der Nachweise von *S. Derby*, *S. Hadar* und *S. Agona* in den Fermentern im Jahr 1999 und von *S.*

Agona und *S. Montevideo* in der Biogasanlage im Jahr 1998 hin (Tabelle 13). Das Auftreten von Serovaren wie *S. Typhimurium* DT104 und *S. Mbandaka* in der Lagune, die in den vorhergeschalteten Kompartimenten nicht nachweisbar waren, deutet hingegen auf eine spätere Kontamination.

Das Vorkommen von Salmonellen in allen untersuchten Anlage-Abschnitten sowie im Fettabscheider zeigt aber auch eine bekannte Problematik auf. Einerseits ist eine Fremdkontamination durch Zufügen von Cosubstraten wie beispielsweise Fettabscheider-Produkten gegeben, andererseits besteht innerhalb der Anlage die Möglichkeit eines kontinuierlichen „Salmonellen-Kreislaufs“: Dadurch dass ein automatisches Umsetzen des Materials ohne eine zwischengeschaltete praxisgerechte Dekontamination stattfindet, besteht das Risiko der Durchmischung kontaminierter Substanz mit bereits entseuchtem Material (PHILIPP et al. 1999). Die hier eingesetzten Cosubstrate Fettabscheiderinhalte und Hühnerkot werden vor der Zugabe zum Fermenter durch einstündiges Erhitzen auf 70°C vorbehandelt, was nach Literaturangaben zu einer Dekontamination führen sollte (EDER 2001; PHILIPP und MARTENS 2000).

Die Ergebnisse in der Biogasanlage zeigen auch, dass Salmonellen während der mesophilen Fermentation nicht vollständig eliminiert werden. Im folgenden sollen die Ursachen hierfür diskutiert werden.

Wir untersuchten zunächst, ob die Parameter „Substrat Gülle“ und eine Temperatur von 37°C, die der mesophilen Fermentation in der Biogasanlage entspricht, das Überleben von *S. Typhimurium* beeinflussen. In unseren orientierenden Untersuchungen zur Tenazität von Salmonellen in Rinderflüssigmist zeigte sich eine deutliche Temperaturabhängigkeit. Eine Lagerungstemperatur von 6°C führte zu einer Halbierung der Ausgangskeimzahlen, nach Lagerung bei 35°C waren nach vier Tagen keine Salmonellen mehr nachweisbar. Bei der langfristigen Lagerung von *S. Typhimurium* DT104-beimpfter Rindergülle bei 7°C wurden in der Gülle der Milchviehanlage I mit Hilfe des MPN-Verfahrens nach einem Jahr noch *S. Typhimurium* nachgewiesen, bei 22°C überlebten die Salmonellen nur acht Wochen, bei 37°C 10-12 Tage.

Die Ergebnisse belegen, dass eine vollständige Salmonelleninaktivierung in Rindergülle im Laborversuch abhängig von der Temperatur ist und besonders

bei niedrigen Temperaturen eine völlige Eliminierung der Salmonellen auch nach sehr langer Lagerung nicht gewährleistet ist. Die hohe Tenazität von Salmonellen geht ebenfalls aus anderen Untersuchungen hervor. Die durchschnittlichen Überlebenszeiten in Rinderflüssigmist werden beispielsweise für *S. Typhimurium* mit 177 Tagen, für *S. Anatum* mit 210 Tagen angegeben (STRAUCH 1987). Salmonellen können in Lebensmitteln bei 4°C und tiefgefroren wochenlang überleben. Bei Hitzebehandlung wird eine zuverlässige Abtötung erst nach einer Einwirkungszeit von einer Stunde bei 55°C oder einer halben Stunde bei 60°C erreicht (BÖHM 1993; ULLMANN und WUNDT 1982).

Unsere Resultate bestätigen die Ergebnisse anderer Studien, die zeigten, dass unter mesophiler anaerober Fermentation wohl eine Reduktion des Keimgehaltes, aber keine Abtötung potentiell pathogener Mikroorganismen, wie der Salmonellen, erreicht werden kann (BENDIXEN 1998; EDER 2001; PHILIPP 1998; PHILIPP und MARTENS 2000; STRAUCH 1981; STROMBERG 1984).

Wir gingen der Frage nach, ob das Überleben von Salmonellen in einer mesophilen Biogasanlage durch den pH-Wert und das gleichzeitige Vorkommen anderer Bakterien beeinflusst wird. Um den keimabtötenden Einfluss verschiedener pH-Werte zu prüfen, verwendeten WALTER-MATSUI und SEIPP (1988) unter mesophilen Bedingungen ein Essigsäure-Milieu und ein Medium, dem Laktobakterien zugesetzt worden waren. Sie ermittelten bei sinkendem pH zurückgehende KBE-Werte von Salmonellen, Shigellen und *E. coli*, aber keine Abtötung der pathogenen Darmbakterien; gleichzeitig sank die Biogasausbeute (WALTER-MATSUI und SEIPP 1988). In Getreidesilage fiel während des Fermentierungsprozesses der pH-Wert auf 5,0 und der Gehalt an titrierbaren Säuren stieg innerhalb von 48 Stunden signifikant an; gleichzeitig kam es zu einer Reduktion des *S. Typhimurium*-Gehaltes mit einer kompletten Wachstums- hemmung nach 72 Stunden (DESSIE et al. 1996).

Der pH-Wert kann in der Biogasanlage in Oberlungwitz nicht für eine Inaktivierung von *S. Typhimurium* verantwortlich sein, da die pH-Werte in den Fermentern I und II im leicht alkalischen Bereich lagen (7,79 bzw. 7,71). Erst ab pH-Werten zwischen 8 und 9 kann es zur Wachstumsbeeinträchtigung von Salmonellen kommen. Im Waschwasser zur Eireinigung, das einen pH von 9 und eine Temperatur von 32-37°C konnte sich *S. Enteritidis* noch vermehren.

Erst ab pH 11 kam es temperaturabhängig zu einer schnellen Abtötung von *S. Enteritidis* (CATALANO und KNABEL 1994). Trotzdem kann ein leichter Anstieg des pH-Wertes im Zusammenhang mit anderen Faktoren die Hygienisierung beschleunigen.

Vermutlich beeinflusst aber auch die Zusammensetzung des Rohsubstrates das Absterbeverhalten der Salmonellen. Bei einem Vergleich der Salmonellengehalte in reinem Flüssigmist waren bei einem Ausgangskeimgehalt von 10^5 KBE/g bereits nach drei Tagen keine Salmonellen mehr nachweisbar. Der Zusatz von 25% Speiseresten verlängerte das Überleben der Salmonellen bei niedrigeren Anfangskeimzahlen (10^4 KBE/g) auf sechs Tage, während bei identischem Anfangskeimgehalt die Zumischung von 50% Speiseabfällen wieder zu einem dreitägigen Überleben führte (GRUNWALD 1995). Auch in der untersuchten Biogasanlage Oberlungwitz wurden Cosubstrate in Form von Fettsäureabscheiderinhalten und Hühnerkot eingesetzt, da sich hierdurch eine höhere Ausbeute an Biogas erzielen lässt (KRASCHINSKI 1995; GROLL 1997; BASERGA 1998; KRIEG 2001). Neben der Beeinflussung der Überlebenszeiten ist zusätzlich eine Gefahr der Rekontamination gegeben, wie unsere Befunde zeigten (s. o.).

Bezüglich des Einflusses der Begleitflora auf das Überleben der Salmonellen bestimmten wir die aerobe Gesamtkeimzahl sowie den Gehalt an *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* und Enterokokken je Milliliter Material. Unter Beachtung der Dynamik der Keimzahlen sind die eigenen Ergebnisse lediglich als Tendenzen zu werten: Die aerobe Gesamtkeimzahl der Rindergülle reduzierte sich auf dem Weg des Substrates von der Milchviehanlage bis zur Lagune um etwa eine Zehnerpotenz. Der Gehalt an *Enterobacteriaceae* verminderte sich um etwa zwei Zehnerpotenzen auf 10^4 . *Escherichia coli* wurden zu Beginn der Fermentation um über 2 Zehnerpotenzen reduziert und stiegen danach leicht an. Enterokokken nahmen im Verlauf kontinuierlich von 10^7 auf 5×10^4 ab. Der Gehalt an Salmonellen schwankte um 0,1 KBE/ml. In einer vergleichbaren Studie reduzierten sich unter mesophilen Bedingungen die als Indikatorkeime angesehenen Fäkalstreptokokken wohl um ein bis zwei Zehnerpotenzen, es wurden aber bis zum Versuchsende nach sechs Wochen regelmäßig noch diese Keime nachgewiesen (MARTENS et al. 1999). In der vorliegenden Dissertation waren so-

wohl in der Nativgülle als auch bei den später im Labor durchgeführten Versuchen unter Zusatz von *S. Typhimurium* DT104 bis zum Versuchsende Enterokokken nachzuweisen.

Zusätzlich zum KOCH'schen Plattenverfahren setzten wir das MPN-Verfahren zum quantitativen Keimnachweis ein. Da mit einer Voranreicherung gearbeitet wird, lassen sich mit Hilfe des MPN-Verfahrens auch subletal geschädigte Erreger nachweisen, so dass hierbei höhere Keimzahlen zu erwarten sind (NÄVEKE und TEPPER 1979). Die mit dem MPN-Verfahren ermittelten Salmonellen-Konzentrationen überstiegen den *E. coli*-Gehalt noch um zwei Zehnerpotenzen. In der Versuchswiederholung fielen die Keimgehalte gleich hoch aus. In der Lagerung bei 22°C wurden beide Keimspezies etwa gleichzeitig aus der Gülle eliminiert, bei der 37°C-Lagerung waren in beiden Versuchen Salmonellen noch zwei bzw. drei Wochen nach dem Absterben der *E. coli* nachweisbar. Auch in der Lagune waren unabhängig von der Lagerungstemperatur *E. coli* mehrere Wochen vor den Salmonellen nicht mehr nachzuweisen. Diese Ergebnisse zeigen, dass *E. coli* als Testkeim für Salmonellen unter den hier untersuchten Bedingungen keine zuverlässigen Resultate liefert. Auch WALTER-MATSUI und SEIPP (1988) kamen zu dem Schluss, dass die Indikatorfunktion von *E. coli* im anaeroben Milieu nicht sicher ausfällt, da in ihren Versuchen mit Klärschlamm die Überlebenszeiten von Salmonellen und *E. coli* teilweise erheblich unterschiedlich ausfielen. Die Autoren folgern, dass offensichtlich die Werte von Überlebenszeiten in einer Anlage nicht ohne Weiteres auf eine andere Anlage übertragen werden können.

LARSEN et al. (1994) fanden, dass in einem zweistufigen Prozess, bei dem einer mesophilen Lagerung eine thermophile Behandlung vorausgeht, sowohl *E. coli* als auch Enterokokken als Indikatorkeime geeignet sind. Unter diesen Bedingungen wurden für pathogene Bakterien ausreichende Keimreduktionen erzielt, um einen ungefährlichen Gebrauch der Vergärungsprodukte in der Landwirtschaft zu ermöglichen. Dies gilt jedoch nicht für die mesophile Behandlung allein. Hier ist nach Ansicht der Autoren lediglich eine Keimreduktion vom Anfangskeimgehalt um 3-4 Zehnerpotenzen ein sicheres Indiz für eine suffiziente Behandlung.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse konnten Wechselwirkungen zwischen den Salmonellen und der Begleitflora nicht sicher ausgeschlossen werden. Daher untersuchten wir die Tenazität von *S. Typhimurium* im bakterienfreien Substrat, das durch Ultrazentrifugation gewonnen wurde und fanden in der ultrazentrifugierten Gülle im Vergleich zur Gülle aus der Lagune ein identisches, langsames Inaktivierungsmuster, während in beiden Fermentern eine schnelle Keimreduktion bis hin zur völligen Inaktivierung innerhalb von fünf Tagen beobachtet wurde. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass das Überleben von *S. Typhimurium* weniger durch die Begleitflora als vielmehr durch Faktoren der mesophilen anaeroben Vergärung beeinflusst werden.

Einer dieser Faktoren kann die Temperatur im Rinderflüssigmist beziehungsweise den einzelnen Kompartimenten der Biogasanlage sein. Die Gesetzmäßigkeiten des Absterbeverhaltens von Mikroorganismen sind für thermische Einwirkungen am besten untersucht worden und leicht zu erfassen, weil hier in der Regel lineare logarithmische Beziehungen zwischen Absterbezeit und Temperatur zu erwarten sind. Für Keime wie beispielsweise *S. Typhimurium* gilt allerdings, dass sie sich bei einem minimalen Nährstoffangebot im Temperaturbereich zwischen 7°C und 47°C vermehren können, so dass sich Absterbe- und Vermehrungsvorgänge unter Umständen überlagern (BÖHM 1993).

In den Laborversuchen zu dieser Dissertation wurde die Tenazität von *S. Typhimurium* DT104 in Rindergülle bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen untersucht. Nach zehn bis zwölf Tagen waren bei 37°C keine Salmonellen nachweisbar. Die Lagerung bei 37°C spiegelt die mesophilen Bedingungen in der Biogasanlage wider. Eine solche Lagerungstemperatur führte in der Regel zu einer deutlichen Titerreduktion von *S. Senftenberg* und *S. Enteritidis* als Indikatorkeime, die sich im Zeitmaßstab von Tagen bzw. Wochen registrieren ließen (MARTENS et al. 1999). In einer anderen Untersuchung bewirkte die mesophile anaerobe Vergärung anfänglich eine rapide Verminderung der Kolonienanzahl von *S. Typhimurium*. Es folgte eine Periode, in der die Keimgehalte um weniger als eine Zehnerpotenz zurückgingen (KEARNEY et al. 1993). Unter anaerober mesophiler Fermentation überlebten Salmonellen im Labor bis zu sechs Tage nach der Beimpfung (GRUNWALD 1995). Andere Untersucher konnten eine komplette Inaktivierung von *S. Typhimurium* nach zwei bis vier

Tagen (OLSEN und LARSEN 1987) oder – wie auch in unseren Untersuchungen – nach zehn Tagen feststellen (GADRE et al. 1986). Ursache für die unterschiedlichen Zeitangaben sind möglicherweise leichte Temperaturschwankungen, denn innerhalb des mesophilen Bereichs bedingen schon geringfügige Temperaturänderungen beispielsweise von 30°C auf 35°C signifikante Veränderungen der bakteriellen Überlebenszeiten (OLSEN und LARSEN 1987).

Mit steigender Temperatur nimmt die Inaktivierung der Salmonellen rapide zu. Tenazitätsversuche bei Temperaturen von 55°C mit *S. Senftenberg* sowie einem Wildstamm von *S. Typhimurium* aus Gülle zeigten, dass beide Serovare innerhalb von vier Stunden inaktiviert wurden (WALTER-MATSUI und SEIPP 1988). Auch in thermophilen Biogasanlagen wurden nach 24-stündigem Aufenthalt im Fermenter bei 55°C keine vermehrungsfähigen Salmonellen mehr nachgewiesen (PLYM-FORSHELL 1995). Für die sehr hitzetoleranten *S. Senftenberg* wird eine Überlebenszeit von lediglich 80 Minuten bei 55°C angegeben (PLYM-FORSHELL 1995), und Variationen in der Thermoresistenz waren die alleinige Ursache für Unterschiede der Tenazität von *S. Duesseldorf* bei der thermophilen Vergärung (CARRINGTON et al. 1982).

Umgekehrt nimmt die Überlebenszeit der Salmonellen bei sinkenden Temperaturen zu. Bei 22°C Lagerungstemperatur überlebte *S. Typhimurium* DT104 aus Rindergülle in der vorliegenden Untersuchung bis zu 9 Wochen, bei 7°C sogar 52 Wochen. Zu vergleichbaren Resultaten kam PLYM-FORSHELL (1995): Bei Lagerung von Gülle in einem Temperaturbereich zwischen 22°C und 27°C überlebten Salmonellen 35 Tage und waren erst nach 42 Tagen inaktiviert.

Basierend auf den Untersuchungsergebnissen von GRUNWALD (1995) und SCHEURER (1986) gingen wir den Fragen nach, ob die während der Fermentation in der Biogasanlage anfallenden, kurzkettigen organischen Säuren Einfluß auf das Überleben von *S. Typhimurium* DT104 haben und eine etwaige Beeinflussung durch eine einzelne Säure oder das Säuregemisch hervorgerufen wird. *S. Typhimurium* zeichnet sich durch eine hohe Säuretoleranz („ATR = acid tolerance response“) aus, die die Zellen bei einem pH-Wert von 3 für einige Stunden schützt (BEARSON et al. 1997). Der Schutz vor extremen Säureeinwirkungen benötigt eine vorherige Anpassung bei einem moderaten pH. Bei einer pH-

Senkung unter 4,5 werden etwa 50 „Säure-Schock-Proteine“ induziert, die für die Säuretoleranz verantwortlich sein sollen (FOSTER 1999).

Während der Methanogenese entstehen bereits in der Fermentationsphase kurzkettige Fettsäuren, wie Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Valeriansäure, Isovaleriansäure (Tabelle 16). In Abhängigkeit von zahlreichen Faktoren, wie beispielsweise der Lagerungs- bzw. Fermentationstemperatur, des pH-Wertes und der bakteriellen Keimflora, sind die Konzentrationen dieser Säuren starken Schwankungen unterworfen (PATNA und JUI 1985; KUTZNESOV et al. 1988; SÜSSENBACH 1988; KOBAYASHI et al. 1989; GRIFFIN et al. 1998). Bei Untersuchungen zum anaeroben Abbau von Hühnerflüssigmist wurden nach 20tägiger Lagerung bei 32°C sehr hohe Konzentrationen an Karbonsäuren nachgewiesen (SCHEURER 1986). Auch in der Rindergülle mit Cosubstraten der Biogasanlage Oberlungwitz traten diese Säuren in vergleichbaren Konzentrationen auf (Tabelle 16). Daher lag es nahe, zu prüfen, ob diese Säuregehalte – entweder als Gemisch oder einzeln – die Tenazität von Salmonellen beeinflussen.

Tabelle 16: Gehalte an organischen Säuren (mg/l) mit unterschiedlichen Lagerungs- und Fermentationsbedingungen in Gülle

	SCHEURER (1986)	SÜSSENBACH (1988)	KOBAYASHI et al. (1989)	GRIFFIN et al. (1998)	KUTZNESOV et al. (1988)	PATNI u.. JUI (1985)	Eigene Untersuchung (2000)
Material und Lagerung	Hühnergülle, 20 Tage, 20°C	Schweinegülle 5 Tage, 15°C	frische Rindergülle	Rindergülle + Klärschlamm, 41-50 Tage, mesophil	Rindergülle 35°C, 1. Fermenter	Rindergülle 146 Tage	Rindergülle + Cosubstrate 38°C, Fermenter I
Ameisensäure	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	< 10
Essigsäure	21 324	7500	3 290	143 ± 12	3 000	147,2 ± 3,2	20 000
Isobuttersäure	1 808	zusammen: 9 800	nicht ermittelt	79 ± 4	nicht ermittelt	5,19 ± 0,08	1 400
Buttersäure	2 783		450	60 ± 9	30	15,7 ± 0,6	4 600
Propionsäure	9 741	4 400	1 030	2 043 ± 177	910	31,6 ± 0,7	9 500
Isovaleriansäure	2 646	zusammen: 1 800	nicht ermittelt	64 ± 6	nicht ermittelt	8,19 ± 0,20	nicht ermittelt
Valeriansäure	902		97	184 ± 10	nicht ermittelt	4,63 ± 0,09	nicht ermittelt
Milchsäure	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	3 200
Capronsäure	nicht ermittelt	500	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt	nicht ermittelt

Es zeigte sich mittels der Methode der minimalen Hemmkonzentration, dass *S. Typhimurium* erst bei hohen Säurekonzentrationen, beispielsweise 40g/l Essigsäure, dann aber bereits nach wenigen Tagen absterben. Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangte BÖHM (1987) im Rahmen von Untersuchungen zur Eignung organischer Säuren als Desinfektionsmittel. Salmonellen zeigten erst in einer Lösung von 40 g/l Propionsäure kein Wachstum mehr. Zitronensäure führte auch in der hohen Konzentration von 40 g/l nach zwei Stunden zu keiner Wachstumshemmung. Salmonellen überlebten in Lösungen aus jeweils 1 g/l Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure und Zitronensäure länger als 120 Minuten. In 5 g/l Ameisensäure überlebten sie 60 Minuten, bei denselben Konzentrationen der drei übrigen Säuren mehr als zwei Stunden. Essigsäure tötete Salmonellen in Konzentrationen von 10 g/l und 20 g/l nach 30 Minuten ab (BÖHM 1987).

Auch bei der Inokulation von Salmonellen-Testkeimsuspension in Säurelösungen waren in unseren Untersuchungen vergleichbar hohe Konzentrationen und Zeitdauern erforderlich, um die Salmonellen zu inaktivieren. Die Ergebnisse machen deutlich, dass keine der getesteten Säuren für sich allein während der Experimente eine Inaktivierung von Salmonellen in der Rindergülle bewirkte. Dies könnte aber auch von der relativ hohen inokulierten Keimdosis ($0,1 \text{ ml } 8 \times 10^8 - 2 \times 10^9 \text{ KBE/ml}$) beeinflusst worden sein. Die erforderlichen hohen Säurekonzentrationen wurden während der anaeroben Fermentation nicht erreicht. Es muss offengelassen werden, ob ein anderes Ergebnis bei Einsaat der in der Gülle ermittelten Salmonellendichte von $1,5-9 \times 10^2 \text{ KBE/ml}$ eingetreten wäre. Selbstkritisch sei festzuhalten, dass in den Ansätzen zur Prüfung der Propionsäure (Tabelle 40), Buttersäure (Tabelle 41) und Valeriansäure (Tabelle 42) das Spektrum der Säurekonzentration nicht weit genug ausgedehnt wurde, um den jeweiligen Hemmeffekt quantitativ nachzuweisen. Hier musste auf die Ergebnisse aus den semiquantitativen Versuchen zurückgegriffen werden.

Nach den oben genannten Erkenntnissen mit einzelnen Säuren wurde ein Säuregemisch aus sechs Säuren hergestellt. Die Säuren wurden in den Konzentrationen zugegeben, die im Inhalt des Fermenters I ermittelt wurden. Mit Hilfe dieses Gemisches wurde in drei Versuchen der Salmonellengehalt von $7 \times 10^6 \text{ KBE/ml}$ innerhalb von durchschnittlich 17 Tagen inaktiviert, es waren keine

Salmonellen mehr nachweisbar. Dies bedeutet, dass in den eigenen Experimenten nur die Kombination aus den normalerweise während der Methanogenese gebildeten Säuren eine Inaktivierung von *S. Typhimurium* bewirkt. Solche synergistischen Wirkungen wurden bislang noch wenig analysiert. VAN LIER et al. (1995) untersuchten den Einfluß organischer Säuren auf die anaerobe, thermophile Konversion von Propionsäure während der Methanogenese durch angereicherte Propionsäure-oxidierende Bakterien in Syntrophie mit *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Sie fanden heraus, dass Zufügen von 50mM Essigsäure den Propionsäureabbau unterdrückt. Der inhibitorische Effekt blieb bestehen, auch als die Essigsäure-Konzentration unter die Nachweisgrenze sank. Der Zusatz von Buttersäure übte keine Hemmung der Methanbildung, wohl aber des Wachstums der Propionsäure-oxidierenden Bakterien aus. Die beschriebenen hemmenden Effekte waren unter thermophilen und mesophilen Bedingungen gleich und entstanden nicht durch eine Beeinflussung des Wasserstoffpartialdrucks (VAN LIER et al. 1993). Ihre Ursache ist vermutlich eine Auswirkung des Eindringens schwacher organischer Säuren in das Zellinnere. Hierdurch kommt es einerseits zu einer Absenkung des intrazellulären pH-Wertes und andererseits zu einer Akkumulierung der Säuren als intrazelluläre Anionen mit resultierender Turgoränderung der Zellmembran (BEARSON et al. 1998; KWON und RICKE 1998).

Erstaunlicherweise wurden unter natürlichen Bedingungen Salmonellen in der vorliegenden Dissertation nach zehn bis zwölf Tagen inaktiviert, während sie unter der Einwirkung des Säuregemischs 17 Tage überlebten. Möglicherweise ist hierfür das Fehlen von Valerian- und Isovaleriansäure verantwortlich, deren Konzentrationen im Substrat des ersten Fermenters nicht ermittelt wurden. Wegen der unbekannten Konzentrationen wurden diese beiden Säuren, wovon SCHEURER (1986) die Isovaleriansäure in Hühnergülle in großen Mengen nachwies, unserem Säuregemisch nicht zugesetzt. Man kann aber auch den Schluß ziehen, dass das verwendete Säuregemisch nicht allein für die Salmonellenreduktion verantwortlich ist, sondern dieses durch synergistische Wirkungen der organischen Säuren mit anderen Faktoren verursacht wird. Aus Kostengründen konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation nur eine Säureanalyse aus dem Material des ersten Fermenters, d. h. aus einem Gemisch von Rindergülle, Geflügelkot und Fettabscheiderinhalten durchgeführt werden.

Unsere Ergebnisse regen jedoch dazu an, weitergehende Untersuchungen beispielsweise mit reiner, fermentierter Gülle durchzuführen.

Abschließend widmeten wir uns der Frage, ob Salmonellen nach der Impfung von Kälbern mit Zoosaloral® in der Gülle und in den Kompartimenten der Biogasanlage nachweisbar waren, und falls ja, ob es sich hierbei Impfstämme oder Wildstämme handelt. In diesem Zusammenhang interessierte auch der Aspekt, ob nachgewiesene Salmonellen die in der Literatur beschriebenen Antibiotikaresistenzen zeigen. Anfangs konnte aus allen Proben der Salmonella-Impfstamm in geringer Keimzahl isoliert werden. Außer in der Gülle der Milchviehanlage I wurde der Impfstamm in der Lagune in geringer Konzentration isoliert. Einmal wurde der epidemiologisch wichtige Stamm *S. Typhimurium* DT104 in der Lagune festgestellt, in zeitlich darauf folgenden Untersuchungen war wieder lediglich der Impfstamm nachweisbar.

Das Vorkommen des Impfstammes in allen Proben reflektiert die in der Milchviehanlage durchgeführten Salmonellose-Schutzimpfungen mit Zoosaloral®. Vom seuchenhygienischen Standpunkt ist das Auftreten des Impfstammes als unproblematisch zu werten, da die lokale Immunisierung des Darmes beim Kalb als physiologische Reaktion durch die Impfung ausgelöst wird. Nach der Darmpassage werden die Impfsalmonellen ausgeschieden. Zoosaloral® ist ein Lebendimpfstoff aus doppelt attenuierten Mutanten, der sich bei Reihenuntersuchungen zur Rückmutationshäufigkeit als stabil erwiesen hat (Robert-Koch-Institut 1999). Die sogenannten Mangelmutanten sind im Gegensatz zu Wildtypbakterien auf Zufuhr essentieller Nährstoffe von außen angewiesen, d. h. auxotroph. Hierdurch können sie sowohl im Darm als auch in der Umwelt nur schlecht wachsen, überleben aber lange genug, um eine Immunantwort auszulösen (FRECH et al. 1998). Die durch den Lebendimpfstoff Zoosaloral® hervorgerufene Ausscheidung des Salmonellen-Impfstammes ist durch seine Auxotrophie für Histidin und Adenin sicher von Wildstämmen zu unterscheiden (FIELDS et al. 1986; LINDE 1980). Dies konnte auch im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nachvollzogen werden (s. Kap. 4.14).

Nach BARROW et al. (1988) reduziert die orale Applikation von Salmonellose-Lebendimpfstoffen die Haftung und Vermehrung von Salmonella-Wildstämmen. Im Gegensatz hierzu wurden nach der Lebendimmunisierung

von Geflügel ein Anstieg der Anzahl von Isolaten anderer Salmonella-Serovare beobachtet (VIELITZ et al. 1992). Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse kann aber eine Haftung und Vermehrung von Wildstämmen mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da in 21 von 22 Untersuchungen der Gülle nur *S. Typhimurium* LT: DT 009 des Zoosaloral®-Impfstammes bzw. in einer Untersuchung *S. Typhimurium* LT: ut/BT: b nachgewiesen wurde (Tabelle 10). Außerdem wurde ab 1997 aus Kotsammelproben des Rinderbestandes nur noch der Impfstamm isoliert.

In der vorliegenden Untersuchung wurden zahlreiche Resistenzen der getesteten Salmonellen-Serovare gegenüber unterschiedlichen Antibiotika festgestellt. Beispielsweise waren alle getesteten Stämme resistent gegenüber Erythromycin und Spectinomycin und reagierten intermediär oder resistent auf Penicillin. Das Wachstum von *S. Typhimurium* DT104 wurde durch Streptomycin, Sulfonamide, Spectinomycin, Erythromycin und Penicillin nicht gehemmt. Hiermit bestätigte sich die aus der Literatur bekannte Multiresistenz dieses Phagentyps. Jedoch stimmte das Spektrum der Antibiotikaunempfindlichkeit nicht vollständig mit den Literaturangaben überein, die von einer Resistenz gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamiden und Tetrazyklinen, der sogenannten ACSSuT-Resistenz berichten (BESSER et al. 1997; BRIGGS und FRATAMICO 1999; CASIN et al. 1999; LOW et al. 1996; THRENLFAL et al. 1996). Die Prävalenz von *Typhimurium* -Isolaten mit einer ACSSuT-Resistenz nahm im Zeitraum 1982 bis 1995 von 0,6% auf 34,0% zu (GLYNN et al. 1998). In Deutschland stieg der Anteil von *S. Typhimurium* -Stämmen, die gegenüber mehr als einem Antibiotikum resistent waren, von 11,% im Jahr 1987 auf 38,1% im Jahr 1996 an (GROSS et al. 1998).

Das abweichende Resistenzmuster und das beobachtete resistente und intermediäre Verhalten gegenüber neun verschiedenen Antibiotika einer Serovar vom Phagentyp DT120 belegen in der vorliegenden Untersuchung das Problem der steigenden Multiresistenz von *S. Typhimurium*. Ursache hierfür ist eine Resistenzbildung, die nicht durch spontane Mutation entsteht, sondern durch transmissible Gene. Während bei spontanen Mutationen die Erbinformation nur vertikal übertragen werden kann, ist bei der transmissiblen Mutation ein Informationsaustausch innerhalb einer Bakterienspezies problemlos durch

Transduktion, Konjugation und Mobilisation von einem Bakterium auf ein anderes möglich (BOLTON et al. 1999). Diese horizontale Verbreitung der Resistenz soll sogar auf nicht-verwandte Spezies möglich sein (BRIGGS und FRA-TAMICO 1999). Die rapide Resistenzsteigerung von *S. Typhimurium* wird auch durch eine amerikanische 15-Jahres-Studie belegt: Während beim Rind im Zeitraum 1982-1985 beispielsweise nur 4,1% der *S. Typhimurium* -Proben gegenüber Chloramphenicol resistent waren, wuchsen 1995-1997 bereits 73,2% der isolierten Salmonellen in Gegenwart dieses Antibiotikums (DAVIS et al. 1999). Beim Menschen stieg der Anteil Chloramphenicol-resistenter *S. Typhimurium* von 3,3% (1985) auf 46,4% (1997) (DAVIS et al. 1999).

Die Zoosaloral®-Impfstämme sind resistent gegenüber Spectinomycin, Erythromycin und Penicillin. Laut Hersteller soll ein Impfstamm immer empfindlich gegen alle Antibiotika sein. Oftmals werden aber gerade die Antibiotika, die hier Resistenzen ausbilden, gar nicht getestet.

Die Beobachtung der Antibiotika-Resistenz ist von großer Bedeutung, da eine Resistenz die Effektivität einer therapeutischen Intervention herabsetzt. Die Untersuchung betriebsspezifischer Resistenzen bei Salmonellen-Subspezies kann hilfreich sein, um Faktoren zu identifizieren, die als Vorbedingung für mögliche Maßnahmen die Antibiotika-Resistenz determinieren (GIBSON et al. 2001). In einigen Betrieben mag es durch den betriebsüblichen Einsatz von Antibiotika zu einer hohen Prävalenz an Antibiotika-Resistenzen kommen (DAVIS et al. 1999). Weiterhin spielen Einflüsse außerhalb der Veterinärmedizin und der Landwirtschaft – beispielsweise eine teilweise unkritische Verwendung von Antibiotika in der Humanmedizin – eine Rolle, daher überrascht es nicht, dass Multi-Resistenzen bei Menschen häufiger als bei landwirtschaftlichen Nutztieren auftreten (RHEAULT und QUESSY 2001). Die hohe Anzahl an multiresistenten Salmonellen-Serovaren erfordern eine engmaschige Überwachung der Antibiotika-Resistenz bei Mensch und Tier.

6 Zusammenfassung

Salmonella Typhimurium DT104 aus einer mesophilen Biogasanlage: Überlebenszeiten und experimentelle Inaktivierung durch ausgewählte organische Säuren

Wilma Staffa

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Mai 2003

159 S., 24 Abb., 41 Tab., 149 Lit., Anhang

Aus Materialien einer mesophilen Biogasanlage wurden Untersuchungen zur natürlichen Inaktivierung von Salmonellen durchgeführt. In dieser Biogasanlage werden zur alternativen Energiegewinnung im zweistufigen Prozess Rinderflüssigmist, Hühnerkot und Fettabscheiderinhalte fermentiert.

Insgesamt konnten in den Jahren 1997-2000 zwölf verschiedene *Salmonella*-Serovare (z. B. *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Hadar*) in den Ausgangsmaterialien, im Fermentationsmaterial und im fertigen Fermentationsprodukt isoliert werden. *Salmonella*-positiv waren die Proben zu 95,5% (n = 22) aus der Rindergülle, zu 69,2% (n = 13) aus dem Fermenter I, zu 50% (n = 20) aus dem Fermenter II, zu 77,3% (n = 22) aus der Lagune und zu 40% (n = 10) aus dem Fettabscheider. Als Quellen der Salmonellen werden die Gülle der Milchviehanlage (besonders für den Impfstamm) sowie Fettabscheiderinhalte diskutiert.

Nach einer Infektion von Rindern mit *S. Typhimurium* in der gülleliefernden Milchviehanlage war nach der Vakzinierung der Kälber der Zoosaloral®-Impfstamm (LT: DT009) in der Gülle häufig nachweisbar. Bei 13 Untersuchungen wurde der Impfstamm zwölfmal in der Gülle der Milchviehanlage, einmal

im Fermentationsprodukt der Biogasanlage und in fünf Proben aus der Lagune isoliert.

Im Laboratorium wurde das Absterben von *S. Typhimurium* DT104 in fermentierender Rindergülle bei Lagerungstemperaturen von 7°C, 22°C und 37°C untersucht. Nach durchschnittlich 10 Tagen waren bei 37°C – dies entspricht etwa der Betriebstemperatur einer mesophilen Biogasanlage – keine Salmonellen nachweisbar. Bei einer Temperatur von 22°C überlebten die Salmonellen neun Wochen, bei 7°C überlebten sie mehr als 52 Wochen.

Der mikrobiologische Abbau von Biomasse führt zur Aufspaltung der Makromoleküle und danach zur Bildung von Karbonsäuren. Nach der Analyse organischer Säuren aus Rindergülle und Cosubstraten wurden Konzentrationen dieser Säuren gegen *S. Typhimurium* DT104 experimentell geprüft. Es wurde der Einfluss von Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter-, Isobutter-, Valerian-, Isovaleriansäure auf die Inaktivierung von *S. Typhimurium* DT104 untersucht. In Versuchen mit den Einzelsäuren und Dosen der Salmonellen, die über den Gehalten nativer Gülle lagen, konnte eine Inaktivierung erst bei Konzentrationen von 10 bis 40 g/l erzielt werden. Da diese Konzentrationen laut der zu Grunde gelegten Gülleanalyse in den jeweiligen Einzelfällen nicht erreicht wurden, erfolgte die Prüfung der Säuren gegenüber den Salmonellen im Komplex. Dazu wurde ein Säuregemisch hergestellt, das den ermittelten Konzentrationen der Säuren in der Rindergülle plus Cosubstraten entspricht und auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt. In dieser Säurelösung wurden Salmonellen täglich um durchschnittlich 0,5 Zehnerpotenzen reduziert und in drei Versuchsansätzen innerhalb von durchschnittlich 17 Tagen inaktiviert. Mit diesen Daten wird der Einfluß von in der Gülle vorkommenden Konzentrationen organischer Säuren auf *S. Typhimurium* DT104 erstmals quantifiziert.

Aus den Untersuchungen wird der Schluß gezogen, dass für das Absterben von *S. Typhimurium* DT104 während der 24 bis 33 Tage andauernden natürlichen Fermentation der Gülle in der Biogasanlage der Anstieg und der Einfluß der Karbonsäuren sehr wesentlich ist.

Die nach der Vakzinierung der Kälber mit dem Lebendimpfstoff Zoosaloral® ausgeschiedenen Salmonellenimpfstämme waren auch nach Passage der Bio-

gasanlage durch ihr auxotrophes Verhalten sicher von Wildstämmen zu unterscheiden. Bei der Untersuchung von Gülle aus mit Salmonella-Lebendvakzinen geimpften Rinderbeständen ist das Mitführen des Bovisal-Diagnostikums® zu empfehlen.

Bei den natürlich vorkommenden Salmonellen-Serovaren wurden zahlreiche Resistenzen gegenüber unterschiedlichen Antibiotika festgestellt. Die Zoosaloral®-Impfstämme wiesen nach der Passage der Biogasanlage keine veränderten Resistenzen auf. Die Zoosaloral®-Impfstämme sind resistent gegen Spectinomycin, Erythromycin und Penicillin.

7 Summary

Salmonella Typhimurium DT104 in a mesophilic biogas plant: Survival times and experimental inactivation by selected organic acids.

Wilma Staffa

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University Leipzig

May 2003

159 pages, 24 figures, 41 tables, 149 references, supplement

We investigated the natural inactivation of *Salmonella* in the stuff of a mesophilic biogas plant where cattle slurry, poultry waste and fat separator contents are fermented in a two-step process for the use of alternative energy recovery.

From 1997 to 2000 we isolated 12 different *Salmonella* serovars (e. g. *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Hadar*) in the native sludge, in the fermenter material and in the fermentation product. The following parts of the samples were *Salmonella*-positive: cattle slurry 95,5% (n = 22), fermenter I 69,2% (n = 13), fermenter II 50% (n = 20), storage tank 77,3% (n = 22), and fat separator 40% (n = 10). As source of the *Salmonella* we assume the slurry of the dairy cattle farm (esp. in the case of vaccine strains) and the fat separator contents.

After an infection of cattle with *S. Typhimurium* in the sludge-producing farm and vaccination of calves with Zoosaloral® the vaccine strain (LT: DT009) was frequently found in the slurry. In the course of 13 tests we isolated the vaccine strain in 12 samples of the biogas plant slurry, in one sample of the fermentation product and in 5 samples of the storage tank.

In laboratory investigations we studied the inactivation of *S. Typhimurium* DT104 in fermented cattle slurry at storage temperatures of 7°C, 22°C, and 37°C. After a mean storage time of 10 days at 37°C (i.e. the working tempera-

ture of the biogas plant) all *Salmonella* were inactivated. At 22°C they survived nine weeks, at 7°C more than 52 weeks.

The microbiologic degradation causes the splitting of macromolecules and the formation of free volatile acids (VFA). After analysis of the VFA in cattle slurry and cosubstrates we tested different concentrations of formic, acetic, propionic, butyric, isobutyric, valerianic, and isovalerianic acid. In tests with the single acids and *Salmonella* concentrations higher than in native slurry an inactivation was achieved at acid concentrations between 10-40 mg/l. Because acid concentrations in native sludge are lower, we examined an acid mixture with acid concentrations equivalent to cattle slurry/cosubstrate at pH 7,3. In the mixture *Salmonella* were daily reduced about 0,5 orders and inactivated in an average of 17 days. These data quantify the influence of VFA concentrations in slurry for the first time.

We concluded that the increase and the influence of VFA are very important for the inactivation of *S. Typhimurium* DT104 during the 24-33 days of slurry fermentation in the biogas plant. After vaccination of calves with the live vaccine Zoosaloral® the excreted *Salmonella* vaccine strains could be distinguished after the passage of the biogas plant by their auxotrophy from wild strains. We recommend the use of Bovisaloral-Diagnostikum® for investigations of slurry from cattle vaccinated with *Salmonella* live vaccine.

The natural *Salmonella* serovars were resistant against numerous antibiotics. The Zoosaloral® vaccine strains showed no deviating resistances after passing the biogas plant. The Zoosaloral® vaccine strains were spectinomycine-, erythromycine- and penicilline-resistant.

8 Literaturverzeichnis

1. AHLGRIMM, H. J., GÄDEKEN, D. (1990): Methan. In: I. SAUERBECK und H. H. BRUNNERT (Hrsg.): Klimaveränderungen und Landwirtschaft, Teil I. Landbauforschung Völkenrode (FAL), Sonderheft 117
2. ALTROCK, A. v. (2001): Results of the German investigation in the EU-project "Salmonella in pork (Salinpork)": Investigations on farms. In: P. VAN DER WOLF (Hrsg.): Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other Food Borne Pathogens in Pork., Leipzig, 2.-5.9.2001: 198-201
3. ANON. (1993): Salmonella in animal and poultry production 1992. Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food, Welsh Office, Agriculture Department, Scottish Office, Agriculture and Fisheries Department, London
4. ANON. (2000): Arbeitsempfehlung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Berlin) zur Resistenzbestimmung schnell wachsender Bakterien in der Veterinärmedizin.
5. BARROW, P. A., SIMPSON, J. M., LOVELL, M. A. (1988): Intestinal colonization in the chicken by food-poisoning Salmonella serotypes; microbial characteristics associated with faecal excretion. Avian Path. 17: 571-588
6. BASERGA, U. (1998): Landwirtschaftliche Co-Vergärungs-Biogasanlagen. Biogas aus organischen Reststoffen und Energiegras. FAT-Berichte Nr. 512: 1-12
7. BEARSON, B. L., WILSON, L., FOSTER, J. W. (1998): A low pH-inducible, PhoPQ dependant acid tolerance response protects Salmonella typhimurium against inorganic acid stress. J. Bacteriol. 180: 2409-2417

8. BEARSON, S., BEARSON, B., FOSTER, J. W. (1997): Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 147: 173-180
9. BENDIXEN, H. J. (1998): Hygienische und sanitäre Anforderungen an dänische Biogasanlagen. Tagungsband "50 Jahre Biogas in der Landwirtschaft". Fachverband Biogas e.V..
10. BESSER, T. W., GAY, C. C., GAY, J. M., HANCOCK, D. D., RICE, D., PRITCHETT, L. C., ERICKSON, E. D. (1997): Salmonellosis associated with *S. typhimurium* DT 104 in the USA. Vet. Rec. 140: 75
11. BIET, J. (1995): Biogaserzeugung aus Rindergülle. In: (Hrsg.): Biogas in der Landwirtschaft - Theorie, Technologie, Einsatz. Freiburger Forschungshefte: 1-31
12. BISPING, W. (1988): Oxidase-negative und fermentative Bakterien. In: W. BISPING (Hrsg.): Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Paul Parey, Berlin-Hamburg: 173
13. BLAHA, T. (1999): Salmonelleninfektionen beim Schwein. *nutztier spiegel* 1/99: 38-42
14. BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT (1993): Umweltpolitik - Klimaschutz in Deutschland - Nationalbericht der Bundesregierung für die Bundesrepublik Deutschland im Vorgriff auf Art. 12 des Rahmenübereinkommens der Vereinten Nationen über Klimaveränderungen. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Eigenverlag, Bonn
15. BÖHM, R. (1987): Organische Säuren als Desinfektionsmittel. *Forum Städte-Hygiene* 38: 356-360

16. BÖHM, R. (1993): Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 100: 275-278
17. BOLTON, L. F., KELLEY, L. C., LEE, M. D., FEDORKA-CRAY, P. J., MAURER, J. J. (1999): Detection of multidrug-resistant Salmonella enteritica serotype typhimurium DT 104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. J. Clin. Microbiol. 37: 1348-1351
18. BREER, C., HESS, E., KELLER, U. (1979): Soll Klärschlamm vor oder nach dem Abfaulen pasteurisiert werden? Gas - Wasser - Abwasser 59: 323-328
19. BRENNER, D. J. (1974): Enterobacteriaceae. In: (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, London
20. BRIGGS, C. E., FRATAMICO, P. M. (1999): Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of Salmonella typhimurium DT 104. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 846-849
21. BUSSE, M. (1985): Enterobakterien als Indikatorkeime für Lebensmittel - Eine kritische Betrachtung. Forum Mikrobiologie 8: 92-99
22. CALVERT, N., STEWART, W. C., REILLY, W. J. (1998): Salmonella typhimurium DT104 infection in people and animals in Scotland: A collaborative study 1993-1996. Vet. Rec. 143: 351-354
23. CARRINGTON, E. G., HARMAN, S. A., PIKE, E. B. (1982): Inactivation of Salmonella during anaerobic digestion in sewage sludge. J. Appl. Biol. 53: 331-334

24. CASIN, I., BREUIL, J., BRISABOIS, A., MOURY, F., GRIMONT, F., COLLATZ, E. (1999): Multidrug-resistant human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France belonging to a DT 104 Clone with the chromosome- und integron-encoded β -lactamase PSE-1. *J. Infect. Dis.* 179: 1173-1182
25. CATALANO, C. R., KNABEL, S. J. (1994): Incidence of *Salmonella* in Pennsylvania egg processing plants and destruction by high pH. *J. Food Protect.* 57: 587-591
26. CHOPRA, A. K., HOUSTON, C. W., PETERSON, J. W., PRASAD, R., MEKALANOS, J. J. (1987): Cloning and expression of the *Salmonella enterotoxin* gene. *J. Bacteriol.* 169: 5095-5100.
27. DA COSTA GOMEZ, C. (2002): Biogas - Mit Visionen die Landwirtschaft der Zukunft gestalten. *Biogas Journal* 2: 6-8
28. D'AOUST, J. (1997): *Salmonella* species. In: M. P. DOYLE, L. R. BEUCHATT, J. MONTVILLE (Hrsg.): *Food microbiology - Fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington D.C.: 129-158
29. DAVIES, A., O'NEILL, P., TOWERS, L., COOKE, M. (1996): An outbreak of *Salmonella typhimurium* DT 104 food poisoning associated with eating beef. *Commun. Dis. Rep. CRD Rev.* 6: 159-162
30. DAVIS, M. A., HANCOCK, D. D., BESSER, T. E., RICE, D. H., GAY, J. M., GEARHART, L., DiGIACOMO, R. (1999): Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* isolates from humans and cattle in the Northwestern United States 1982-1997. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 802-806

31. DE MAN, J. C. (1983): MPN-tables, corrected. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 301-305
32. DESSIE, G., ABEGAZ, K., ASHENAFI, M. (1996): Fate of Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium during the fermentation of siljo. East Afr. Med. J. 73: 432-434
33. DÖHLER, H., SCHWAB, M., SCHULTHEISS, K., SCHIESSL, L. (1999): Verlustarme und umweltgerechte Gülleverwertung. In: D. e. V. (Hrsg.): Tagungsband: Gülleverwertung - Neue Ansätze für die Landwirtschaft (Gülzow 1999), Frankfurt/Main: 37-53
34. EDER, B. (2001): Hygienisierungswirkung von Biogasanlagen. In: H. SCHULZ und B. EDER (Hrsg.): Biogas-Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele. ökobuch, Staufen bei Freiburg: 130-136
35. EUZÉBY, J. P. (2001): List of bacterial names with standing in nomenclature. Internet-Veröffentlichung (www.bacterio.cict.fr)
36. EVANS, S., DAVIES, R. (1996): Case control study of multiple resistant Salmonella typhimurium DT 104 infection of cattle in Great Britain. Vet. Rec. 139: 557-558
37. FACHVERBAND BIOGAS e. V. (2002): persönliche Mitteilung
38. FEHLHABER, K. (2002): Verbraucherschutz in der Direktvermarktung. 4. Jahrestagung Thüringer Landwirtschaft, Erfurt, 27.2.2002, Proceedings 7-9
39. FIELDS, P. I., SWANSON, R. V., HAIDARIS, C. G., HEFRON, F. (1986): Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 5189-5193

40. FONE, D. L., BARKER, R. M. (1994): Association between human and farm animal infections with *Salmonella typhimurium* DT 104 in Herefordshire. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 4: 136-140
41. FOSTER, J. W. (1999): When protons attack: Microbial strategies of acid adaptation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 170-174
42. FRECH, G., SCHWARZ, S. (2000): Untersuchungen zur Antibiotikaresistenz zoonotisch relevanter *Salmonellen* vom Geflügel und anderen landwirtschaftlichen Nutztieren. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* 43: 70
43. FRECH, G., WEIDE-BOTJES, M., NUßBECK, E., RABSCH, W., SCHWARZ, S. (1998): Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* DT009 isolates: Differentiation of the live vaccine strain Zoosaloral from field isolates. *FEMS Microbiology letters* 167: 263-269
44. FRIEDMAN, C. R. (1998): An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* serotype *typhimurium* definitive type 104 (DT 104) infections in humans and cattle in Vermont. Presented at the First International Conference on Emerging Infectious Diseases. 8.-11. März 1998, Atlanta/USA
45. GADRE, R. V., RANADE, D. R., GODBOLE, S. H. (1986): A note on survival of *salmonellas* during anaerobic digestion of cattle dung. *J. Appl. Bacteriol.* 60: 93-96

46. GERICKE, B., CLAUS, H., VOIGT, M., TSCHÄPE, H., RASCH, G., HOLLER, H., WAGNER, H. (1999): Die epidemiologische Situation der Salmonellose in Deutschland 1997. Vergleich einer Sentinel-Studie mit anderen Datenquellen. Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 42
47. GIBSON, K., BLAHA, T., FEDORKA-CRAY, P. (2001): Investigations into salmonella serovar and antimicrobial resistance patterns in commercial swine herds. In: P. VAN DER WOLF (Hrsg.): Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other Food Borne Pathogens in Pork., Leipzig, 2.-5.9.2001: 387-391
48. GLYNN, M. K., BOPP, C., DEWITT, W., DABNEY, P., MOKHTAR, M., ANGULO, F. J. (1998): Emergence of multidrug-resistant Salmonella enterica serotype typhimurium DT104 infections in the United States. N. Engl. J. Med. 338: 1333-1338
49. GOLDSTEIN, N., YANKO, A. W., WALKER, J. M., JAKUBOWSKI, W. (1988): Determining pathogen levels in sludge components. Bio Cycle 2: 44-47
50. GREIN, T., O'FLANAGAN, D., MCCARTHY, T., BAUER, D. (1999): An outbreak of multidrug-resistant Salmonella typhimurium food poisoning at a wedding reception. Ir. med. J. 92: 238-241
51. GRIFFIN, M. E., McMAHON, K. D., MACKIE, R. I., RASKIN, L. (1998): Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. Biotechnol. Bioeng. 57: 342-355

52. GROISMAN, E. A., FIELDS, P. I., HEFFRON, F. (1990): Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis. In: B. H. IGLEWSKI und V. L. H. CLARK (Hrsg.): The bacteria. Vol. XI: Molecular basis of bacterial pathogenesis. Academic Press, San Diego/Kalifornien
53. GROLL, A. (1997): Erfassung und Bewertung verfahrenstechnischer Kenngrößen an einer Gemeinschaftsbiogasanlage mit Kofermentation. Diplomarbeit, Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen, Universität Hohenheim
54. GROSS, U., TSCHÄPE, H., BEDNAREK, I., FROSCH, M. (1998): Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17: 385-387
55. GROßKLAUS, D. (1993): Salmonellen und gesundheitlicher Verbraucherschutz. Tierärztl. Prax. 21: 491-497
56. GRUNWALD, R. (1995): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zur gemeinsamen anaeroben Fermentation von Gülle und Speiseresten in Biogasanlagen. Agrarwiss. Diplomarbeit, Inst. für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim
57. HACKETT, J., WYK, P., REEVES, P., MATHAN, V. (1987): Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. J. Infect. Dis. 155: 540-549
58. HEEL, M. (1983): Hygienisch-bakteriologische Untersuchungen an mesophil und thermophil betriebenen Biogasreaktoren. Diplomarbeit, Universität Hohenheim, Institut für Tiermedizin und Tierhygiene

59. HEROLD, T., Kliche, R., HENSEL, A. (1999): Einfluß der aeroben Fermentation auf die Überlebensfähigkeit von *Salmonella typhimurium* (DT 104) und *Escherichia coli* in Schweinevollgülle. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112: 448-453
60. HOGUE, A., AKKINA, J., ANGULO, F., JOHNSON, R., PETERSEN, K., SAINI, P., SCHLOSSER, W. (1997): *Salmonella typhimurium* DT 104 situation assessment. A report from the United States Department of Agriculture and the Centers for Disease Control and Prevention, December 1997
61. HOSEK, G., LESCHINSKY, D., IRONS, S., SAFRANEK, T. J. (1997): Multidrug-resistant *Salmonella* serotype *typhimurium* - United States, 1996. MMWR Weekly 46: 308-310
62. HÜFFMEIER, H. (1984): Fest- und Flüssigmistanfall und Verwertung in der Bundesrepublik Deutschland. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 91: 232-233
63. JENS, P. N. (1994): Salmonelleninfektionen in Kälbermastbeständen Niedersachsens. Vorkommen, Bedeutung und Bekämpfung unter besonderer Berücksichtigung der Anwendung eines *Salmonella typhimurium*-Lebendimpfstoffes. Diss. med. vet., Hannover
64. KEARNEY, T. E., LARKIN, M. J., LEVETT, P. N. (1993): The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. J. Appl. Bacteriol. 74: 86-93
65. KIM, W. I., JUNG, B. Y., KIM, K. T., CHO, K. H., TAK, R. B., KIM, B. W. (2001): Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT 104 by Multiplex PCR. In: P. VAN DER WOLF (Hrsg.): Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Food Borne Pathogens in Pork., Leipzig, 2.-5.9.2001: 594-597

66. KIRCHNER, N. (1995): Umweltrechtliche und abfallwirtschaftliche Rahmenbedingungen für die Nutzung von Biogasanlagen zur Behandlung von organischen Abfällen. TWB, Frankfurt
67. KNOP, M., PÖHLE, H., BERGMANN, A. (1996): Untersuchungen zur Hygienisierung von Bioabfall-Kompost anhand des Testkeims *Salmonella enteritidis* und Überlebensfähigkeit von Salmonellen im Sickerwasser. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 109: 451-456
68. KOBAYASHI, S., ARAI, Y., WADA, N., ISHIMARU, K. (1989): Digestion characteristics of practical methane fermentation plant for the organic matter of dairy cattle manure. Japanese J. Zootechn. Sci. 60: 1093-1101
69. KÖHLER, B. (1993): Beispiele für die Anreicherung von Salmonellen in der Umwelt. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 100: 249-300
70. KÖNIG, T. (2002): Mit Biogas in die Zukunft. Biogas Journal 2: 24
71. KOO, F. C. W., PETERSON, J. W., HOUSTON, C. W., MOLINA, N. C. (1984): Pathogenesis of experimental salmonellosis: Inhibition of protein synthesis by cytotoxin. Infection and Immunity 43: 93-100
72. KRASCHINSKI, S. (1995): Untersuchungen zur gemeinsamen Vergärung von Rindergülle und Speiseabfall zur Biogasgewinnung. Diplomarbeit, Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen, Universität Hohenheim.
73. KRIEG, A. (2001): Cofermentation von organischen Reststoffen. In: H. SCHULZ und B. EDER (Hrsg.): Biogas-Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele. ökobuch, Staufen bei Freiburg: 116-129

74. KÜHN, H., TSCHÄPE, H. (1995): Salmonellosen des Menschen - Epidemiologische und ätiologische Aspekte. RKI Schriften 3/95: 1-204
75. KUTZNETSOV, L. E., NOZHEVNIKOVA, A. N., NEKRASOVA, V. K., SLOBODKIN, A. I., SIMANKOVA, M. V., VEDENINA, I. Y. (1988): Microbiological study of a three-section horizontal biogas fermenter, fueled with cattle manure. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* 25: 540-547
76. KWON, Y. M., RICKE, S. C. (1998): Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3458-3463
77. LARSEN, H. E., MUNCH, B., SCHLUNDT, J. (1994): Use of indicators for monitoring the reduction of pathogens in animal waste treated in biogas plants. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 195: 544-555
78. LIESEGANG, A., PRAGER, R., STRECKEL, W., GERICKE, B., SELTMANN, G., HELMUTH, R., TSCHÄPE, H. (1997): Wird der *Salmonella enteritica*-Stamm DT 104 des Serovars Typhimurium der neue führende Epidemiotyp in Deutschland? RKI-Schriften 1/97: 6-10
79. LINDE, K. (1980): Herstellung von stabilen *Salmonella*-Impfstämmen durch Kopplung von zwei unabhängig voneinander nichtvermehrungsbegrenzenden attenuierenden markers. *Arch. Exper. Vet. Med.* 34: 19-32
80. LOW, C. J., HOPKINS, G., KING, T., MUNRO, D. (1996): Antibiotic resistant *Salmonella typhimurium* DT 104 in cattle. *Vet. Rec.* 4: 130-135

81. LUDEWIG, M., AHRENS, A., FEHLHABER, K. (2001): Comprehensive serological and bacteriological investigations of the Salmonella prevalence of slaughter swine in Saxony (Germany.). In: P. VAN DER WOLF (Hrsg.): Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other Food Borne Pathogens in Pork., Leipzig, 2.-5.9.2001: 195-197
82. LUDWIG, H.-J., CALSOW, P. (1992): Versuche zur Vorbeuge von Salmonelleninfektionen bei Legehennen durch Impfung. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 195: 96-99
83. MACK, H. (1986): Untersuchungen zur Verbreitung der Aujeszky'schen Krankheit durch Stallluft und Abfälle aus tierischer Produktion unter der Berücksichtigung der desinfizierenden Wirkung von Kalk und Formaldehyd auf das Herpesvirus suis in Schweinegülle. Diss. med. vet., Gießen
84. MARTENS, W., FRANK-FINK, A., PHILIPP, W., WINTER, D., BÖHM, R. (1999): Seuchenhygienische Bewertung von Anaerobverfahren. In: (Hrsg.): 7. Hohenheimer Seminar - Biologische Abfallbehandlung - Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Gießen. 1: 150-163
85. MAURER, M., WINKLER, J. P. (1980): Biogas. Technische Grundlagen - Bau und Betrieb von Anlagen. Verlag C. F. Müller, Karlsruhe
86. MENG, J., DOYLE, M. P. (1998): Emerging and evolving microbial food-borne pathogens. Bull. Inst. Pasteur. 96: 151-164

87. METHLING, W., MEHLHORN, G. (1985): Aktuelle Aspekte der Anwendung des Indikatorkeimkonzeptes in der Tierhygiene. In: H. G. HILLIGER (Hrsg.): Proceedings des V. Internationalen Kongresses für Tierhygiene. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Gießen: 183-188
88. METZGER, H. J. (1994): Der BMFT-Förderschwerpunkt "Umweltverträgliche Gülleaufbereitung und -verwertung". In: K. f. T. u. B. i. d. L. (KTBL) (Hrsg.): Umweltverträgliche Gülleaufbereitung, Darmstadt: 7-10
89. MEYER, H. (1999): Tiere als Infektionsquelle für den Menschen - Salmonellen. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 106: 309-372
90. MEYER, H., STEINBACH, G., METHNER, U. (1993): Bekämpfung von Salmonella-Infektionen in Tierbeständen - Grundlage der Reduzierung des Salmonelleneintrags in Lebensmitteln. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 100: 249-300
91. MOSSEL, D. A. A. (1982): Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. Antonie van Leeuwenhoek 48: 609-611
92. MÜNCH, B., LARSEN, H. E., AALBAEK, B. (1987): Experimental studies on the survival of pathogenic and indicator bacteria in aerated and non-aerated cattle and pig slurry. Biol. Wastes 22: 49-65
93. NÄVEKE, R., TEPPER, K. P. (1979): Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden. Gustav Fischer Verlag, Jena
94. OLSEN, J. E. (1988): Studies on the reduction of pathogenic and indicator bacteria in liquid pig manure treated by sedimentation and anaerobic filter digestion for methane generation. Biol. Wastes 24: 17-26

95. OLSEN, J. E., LARSEN, H. E. (1987): Bacterial decimation times in anaerobic digestions of animal slurries. *Biol. Wastes* 21: 153-168
96. PARDON, P., SANCHEZ, R., MARLY, J. (1990): Experimental ovine Salmonellosis (*Salmonella abortus ovis*): Pathogenesis and vaccination. *Res. Microbiol.* 141: 945-953
97. PATNA, N. K., JUL, P. Y. (1985): Volatile fatty acids in stored dairy-cattle slurry. *Agricultural Wastes* 13: 159-178
98. PAUL, C., SHAKALA, K., WARREN, R., SMITH, R. (1985): Adaptive transfer of murine host protection to salmonellosis with T-cell growth factor-dependent, salmonella-specific T-cell lines. *Infect. Immunol.* 48: 40-43
99. PENNY, C. D., LOW, J. C., NETTLETON, P. F., SCOTT, P. R., SARGISON, N. D., STRACHAN, W. D., HONEYMAN, P. C. (1996): Concurrent bovine viral diarrhoea virus and *Salmonella typhimurium* DT 104 infection in a group of pregnant dairy heifers. *Vet. Rec.* 138: 483-489
100. PEREZ, J., ASTORGA, R., CARRASCO, L., MENDEZ, A., PEREA, A., SIERRA, M. A. (1999): Outbreak of salmonellosis in farmed European wild boars (*Sus scrofa ferus*). *Vet. Rec.* 145: 464-465
101. PHILIPP, W. (1998): Ausbringung von Biogasgülle in Wasserschutzgebieten. In: F. B. e.V. (Hrsg.): 50 Jahre Biogas in der Landwirtschaft

102. PHILIPP, W., BREITENFELD, P., FRANK-FINK, A., MARTENS, W., WINTER, D., BÖHM, R. (1999): Seuchenhygienische Bewertung der anaeroben Bioabfallbehandlung im Vergleich zur aeroben Kompostierung. Stand von Wissenschaft, Forschung und Technik zu siedlungshygienischen Aspekten der Abfallentsorgung und -verwertung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene Nr. 104, Bd. 30: 77-104
103. PHILIPP, W., MARTENS, W. (2000): Hygieneuntersuchungen - Anforderungen, Probleme, Lösungswege. Tagungsband "Mit Biogas ins nächste Jahrtausend". Fachverband Biogas e.V.
104. PIKE, E. B. (1984): Indicators of pollution and efficacy of treatment-significance and methodology. In: (Hrsg.): L'HERMITE, P., OTTE, H. (Hrsg.). D. Reidel Publishing, Dordrecht-Boston-Lancaster: 213-219
105. PLYM-FORSHELL, L. (1995): Survival of salmonellas and Ascaris suum eggs in a thermophilic biogas plant. Acta Vet. Scand. 36: 79-85
106. POPPE, C., SMART, N., KHAKHRIA, R., JOHNSON, W., SPIKA, J., PRESCOTT, J. (1998): Salmonella typhimurium DT 104: A virulent and drug-resistant pathogen. Can. Vet. J. 39: 559-565
107. RAPP, A. (1995): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zum Verhalten von ausgewählten Bakterien und Viren während der längerfristigen Speicherung von Flüssigmist in Güllegemeinschaftsanlagen. Diss., Universität Hohenheim

108. RHEAULT, N., QUESSY, S. (2001): Prevalence and resistance patterns of *Salmonella* spp. serotypes from humans and production animals in Canada. In: P. VAN DER WOLF (Hrsg.): Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Food Borne Pathogens in Pork., Leipzig, 2.-5.9.2001: 195-197
109. Robert-Koch-Institut (1998): Zur Situation bei ausgewählten meldepflichtigen Infektionskrankheiten im Jahr 1997. Teil 1: Gastroenteritiden (I) - Salmonellose. Epidemiologisches Bulletin 8/98: 47-49
110. Robert-Koch-Institut (1999): Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung von zwei *Salmonella typhimurium*-Impfstämmen für Hühner (Impfstoffe Zoonosoral H bzw. TAD *Salmonella vac T*) als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten. Internet-Veröffentlichung
111. ROLLE, M., MAYR, A. (2001): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Ferdinand Enke, 7. Aufl., Stuttgart
112. RÜCKERT, V. (1991): Mikrobiologische Untersuchungen zur aeroben und anaeroben Flüssigmistbehandlung., Diss., Universität Hohenheim
113. SCHERER, P. A. (1995): Vergärung. In: K. J. THOMÉ-KOZMIENSKY (Hrsg.): Biologische Abfallbehandlung. EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin: 359-402
114. SCHEURER, E. (1986): Untersuchungen zum Abbau von Hühnerflüssigmist. Diss., Hohenheim
115. SCHOONDERWOERD, M., FENTON, R., STONE, W. (1988): *Salmonella typhimurium* infection in Alberta livestock. In: 38th Conf. Can. Lab. Workers Anim. Dis., 31.5.-1.6.1988

116. SCHROETER, A., PIETZSCH, O., STEINBECK, A., BUNGE, C., BÖTTCHER, U., WARD, L. R., HELMUTH, R. (1991): Epidemiologische Untersuchungen zum Salmonella-enteridis-Geschehen in der Bundesrepublik Deutschland 1990. Bundesgesundheitsbl. 4: 147-151
117. SCHULZ, H., EDER, B. (2001): Biogas Praxis. Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele. ökobuch Verlag, Staufen bei Freiburg
118. SCHWARTZ, K. J. (1991): Salmonellosis in swine. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 13: 139-147
119. SIXT, H. (1983): Anaerobe biologische Verfahren. In: A. V. e.V. (Hrsg.): Handbuch der Abwassertechnik. St. Augustin Verlag, Berlin-München
120. STADLBAUER, E. A. (1982): Methanbildung durch anaerobe Fermentation. In: E. A. STADLBAUER, H. SIXT, G. KONSTANDT (Hrsg.): Biogasanlagen. Kontakt und Studium Band 103. expert verlag, Grafenau/Württemberg
121. STEINBACH, G., MEYER, H., KOCH, H., HEILMANN, P. (1985): Zum Mechanismus der Immunität nach oraler Immunisierung des Kalbes mit dem Salmonella-dublin-Lebendimpfstoff Bovisoral "Dessau". Mh. Vet. Med. 40: 415-418
122. STRAUCH, D. (1981): Hygienische Gesichtspunkte der Lagerung und Ausbringung von Stallmist und Gülle. D. Tierzüchter 33: 149-150
123. STRAUCH, D. (1987): Hygiene of animal waste management. In: D. H. STRAUCH (Hrsg.): Animal production and environmental health. Elsevier, S. 155-202, Amsterdam

124. STRAUCH, D. (1988): Krankheitserreger in Fäkalien und ihre epidemiologische Bedeutung. Tierärztl. Praxis 3: 21-27
125. STRAUCH, D. (1990a): Dünger aus der Tierhaltung - ein Umweltproblem? Forum Städte-Hygiene 41: 126-132
126. STRAUCH, D. (1990b): Zur Problematik der Gülleausbringung in Wasserschutzgebieten. Forum Städte-Hygiene 41: 206-208
127. STRAUCH, D., PHILIPP, W., MENKE, G., BRUNS, C. (1993): Aspekte der Hygiene (Humanhygiene, Veterinärhygiene und Phytohygiene) und des Arbeitsschutzes. KTBL: 109-124
128. STROMBERG, A. V. (1984): Mesophiler aerober bzw. fakulatativ anaerober Keimbesatz von Frischgülle und Faulschlamm der Biogasgewinnung. Vet. med. Diss., München
129. SÜSSENBACH, D. (1988): Untersuchungen zur aeroben mikrobiellen Futtereisweißgewinnung aus Schweinegülle. Diss., Akademie der Landwirtschaftswissenschaften, Potsdam
130. THAUER, R. K., FUCHS, G. (1979): Methanogene Bakterien. Naturwissenschaften 66: 89-94
131. THRENLFAL, E. J., FROST, J. A., WARD, L. R., ROWE, B. (1996): Increasing spectrum of resistance in multiresistant Salmonella typhimurium. Lancet 347: 1053-1054
132. TIETJEN, C. (1978): Zusammensetzung, Eigenschaften und Verhalten tierischer Exkremente. In: D. STRAUCH, A. BAADER. TIETJEN (Hrsg.): Abfälle aus der Tierhaltung. Eugen Ulmer, Stuttgart

133. ULLMANN, U. (1982): Die Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* und *Serratia*. In: H. BRANDIS und H. J. OTTE (Hrsg.): Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York: 291-303
134. ULLMANN, U., WUNDT, W. (1982): Die Familie der Enterobacteriaceae. Die Gattungen *Salmonella* und *Shigella*. In: H. BRANDIS und H. J. OTTE (Hrsg.): Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York
135. VAN LIER, J. B., GROLLE, K. C., FRIJTERS, C. T., STAMS, A. J., LETTINGA, G. (1993): Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1003-1011
136. VANDENBOSCH, J. L., RABERT, D. K., JONES, G. W. (1987): Plasmid-associated resistance of *Salmonella typhimurium* to complement activated by the classical pathway. *Infection and Immunity* 55: 2645-2652
137. VETTER, H., STEFFENS, G. (1986): Wirtschaftseigene Düngung umweltschonend - bodenpflegend - wirtschaftlich. DLG-Verlag, Frankfurt/Main
138. VIELITZ, E., CONRAD, C., VOSS, M., LÖHREN, U., BACHMEIER, J., HAHN, I. (1992): Immunisierung gegen *Salmonella*-Infektionen mit Lebend- und Inaktivat-Vakzinen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 99: 483-485
139. VOLLMER, G.-R. (2000): Erfahrungen mit anaeroben Anlagen. Brandenburgische Umwelt Berichte (BUB) 6: 207-213

140. WALL, P. G., MORGAN, D., LAMDEN, K. (1994): A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT 104 in England und Wales. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 4: 130-135
141. WALTER-MATSUI, R., SEIPP, M. (1988): Das Verhalten pathogener Mikroorganismen und Parasiten bei der Biogas-Produktion aus Klärschlämmen und Siedlungsabfällen. *Forum Städte-Hygiene* 39: 77-82
142. WANDREY, C., AIVASIDIS, A. (1983): Continuous anaerobic digestion with *methanosarcina barkeri*. *Ann. New York Acad. Sci.* 111: 489-500
143. WARD, L. J., DE SA, J. D. H., ROWE, B. (1987): A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidem. Inf.* 99: 291-294
144. WASYL, D., HOSZOWSKI, A. (2001): Antibiotic susceptibility in *Salmonella* swine isolates. In: P. VAN DER WOLF (Hrsg.): *Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other Food Borne Pathogens in Pork*, Leipzig, 2.-5.9.2001: 428-431
145. WEDEKIND, P., VOLLMER, G. R., LINKE, B., STEINMETZ, W., REIMANN, W., ASMUS, F., HERRMANN, V., KOSS, U. (1988): *Anaerobe Aufbereitung von Gülle mit Biogasgewinnung*. Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, Institut für Landwirtschaftliche Information und Dokumentation, Band 26 (13)
146. WENZLAFF, R. (1981): *Erfahrungen mit Biogas im praktischen Betrieb*. Landwirtschaftsverlag, Münster-Hiltrup

147. WIEDENMANN, A. W., LANGHAMMER, K., BOTHENHARDT, K.
(1988): Enterobakterien als Qualitätskriterium bei Roh-, Trink- und Badewasser. Zbl. Bakt. Hyg. 187: 91-106
148. WINOKUR, P. L., BRUEGGEMANN, A., DeSALVO, D. L., HOFFMANN, L., APLEY, M. D., UHLENHOPP, E. K., PFALLER, M. A., DOERN, G. V.
(2000): Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2777-2783
149. WUNDT, W. (1984): Die Familie Enterobacteriaceae. Die Gattungen *Salmonella* und *Shigella*. In: H. BRANDIS und H. J. OTTE (Hrsg.): Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York: 268-290

9 Anhang

Tabelle 17: Überleben von *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) in der Gülle der Milchviehanlage I, im Substrat des ersten und zweiten Fermenters sowie im Material der Lagune bei einer Lagerungstemperatur von 37°C

Zeit	MVA	Fermenter I	Fermenter II	Lagune
0 Stunden	1,10E+07	1,10E+07	1,10E+07	1,10E+07
6 Stunden	9,00E+06	1,10E+07	1,50E+07	9,00E+06
12 Stunden	3,80E+06	7,00E+06	1,10E+07	7,00E+06
1 Tag	4,00E+06	1,40E+05	2,00E+05	3,80E+06
2 Tage	2,10E+05	2,00E+03	9,00E+02	4,00E+03
3 Tage	2,00E+04	4,00E-01	1,50E+01	4,00E+01
4 Tage	7,00E+02	n.n.	9,00E-01	9,00E-01
5 Tage	2,30E+02	n.n.	n.n.	n.n.
Wiederholung 1				
Zeit	MVA	Fermenter I	Fermenter II	Lagune
0 Stunden	2,10E+07	2,10E+07	2,10E+07	2,10E+07
6 Stunden	2,30E+07	1,50E+07	1,50E+07	2,10E+07
12 Stunden	2,30E+07	1,10E+07	9,00E+06	9,00E+06
1 Tag	1,50E+07	5,00E+05	1,50E+05	5,00E+05
2 Tage	2,10E+06	3,80E+03	7,00E+02	1,50E+02
3 Tage	1,10E+06	n.n.	9,00E-01	4,00E-01
4 Tage	9,00E+03	n.n.	4,00E-01	n.n.
5 Tage	2,30E+02	n.n.	n.n.	n.n.
Wiederholung 2				
Zeit	MVA	Fermenter I	Fermenter II	Lagune
0 Stunden	2,60E+07	2,40E+07	2,80E+07	2,60E+07
6 Stunden	2,80E+07	2,10E+07	2,10E+07	2,00E+07
12 Stunden	2,10E+07	1,20E+07	1,70E+07	1,40E+07
1 Tag	1,70E+07	8,10E+06	7,10E+06	1,10E+07
2 Tage	3,30E+06	2,00E+04	9,00E+01	2,00E+03
3 Tage	1,40E+06	2,10E+00	1,50E+00	2,30E+00
4 Tage	4,50E+03	9,00E-01	4,00E-01	n.n.
5 Tage	2,30E+02	4,00E-01	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Tabelle 18: Überleben von *S. Typhimurium* DT104 (in KBE/ml) in der flüssigen Phase (Ultrazentrifugation) der Gülle der Milchviehanlage I, der Substrate des ersten und zweiten Fermenters sowie in der Lagune bei einer Lagerungstemperatur von 37°C

Zeit	MVA	Fermenter1	Fermenter2	Lagune
0 Stunden	2,30E+07	1,90E+07	2,10E+07	2,20E+07
6 Stunden	2,40E+07	3,20E+06	1,90E+06	3,60E+06
12 Stunden	1,10E+07	6,90E+05	2,70E+05	1,90E+06
1 Tag	8,60E+06	3,70E+04	7,70E+04	2,70E+05
2 Tage	5,80E+06	5,20E+03	9,00E+03	6,50E+05
3 Tage	4,70E+06	2,60E+03	4,50E+02	1,50E+05
4 Tage	3,90E+06	7,20E+02	1,20E+02	3,10E+04
5 Tage	1,00E+05	n.n.	n.n.	1,80E+04
Wiederholung 1				
Zeit	MVA	Fermenter1	Fermenter2	Lagune
0 Stunden	1,20E+07	1,60E+07	1,20E+07	1,30E+07
6 Stunden	4,10E+06	5,50E+04	6,40E+04	1,20E+06
12 Stunden	4,50E+06	3,60E+04	2,30E+04	5,00E+05
1 Tag	4,20E+06	8,80E+03	1,30E+04	1,60E+05
2 Tage	3,20E+06	1,50E+03	2,40E+03	1,50E+05
3 Tage	2,30E+06	3,20E+01	4,50E+02	2,00E+04
4 Tage	4,10E+05	1,40E+01	3,60E+02	1,30E+04
5 Tage	1,30E+05	n.n.	6,20E+01	1,60E+04
Wiederholung 2				
Zeit	MVA	Fermenter1	Fermenter2	Lagune
0 Stunden	1,10E+07	1,10E+07	1,90E+07	1,80E+07
6 Stunden	1,70E+07	1,50E+05	1,70E+05	3,00E+06
12 Stunden	1,20E+07	5,00E+04	2,90E+04	8,70E+05
1 Tag	4,10E+06	1,70E+04	1,30E+04	1,80E+06
2 Tage	2,40E+06	1,70E+03	8,70E+02	1,50E+06
3 Tage	2,10E+06	5,50E+01	1,70E+02	2,20E+06
4 Tage	1,80E+06	n.n.	1,40E+02	1,00E+05
5 Tage	1,30E+05	n.n.	1,40E+01	1,50E+05

n.n.: nicht nachweisbar

Tabelle 19: Orientierende Untersuchungen zu Überlebenszeiten nativer Salmonellen (KBE/ml) in zwei Proben Rinderflüssigmist bei einer Lagerung von 35°C und 6°C

Probe 1							
Aufbewahrung der Gülle	Ausgangs-Keimzahl	nach 4h	nach 1d	nach 2d	nach 3d	nach 4d	nach 5d
35°C	20	5	4	0,4	0,04	n.n.	n.n.
6°C	20	n.d.	n.d.	11	n.d.	9	n.d.
Probe 2							
Aufbewahrung der Gülle	Ausgangs-Keimzahl	nach 4h	nach 1d	nach 2d	nach 3d	nach 4d	nach 5d
35°C	9	9	0,4	0,21	0,09	n.n.	n.n.
6°C	9	n.d.	n.d.	4	n.d.	4	n.d.

n.n.: nicht nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

Tabelle 20a: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. KP (KBE/ml)	Salm. MPN (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,00	7,14	1,40E+07	n.d.	3,60E+07	5,20E+05	2,50E+05
1	6,87	7,26	6,00E+06	n.d.	2,40E+07	3,60E+05	3,80E+05
2	6,99	7,10	1,10E+07	n.d.	5,40E+07	4,20E+05	9,90E+04
3	6,75	7,05	1,10E+07	n.d.	2,80E+07	2,10E+05	8,60E+04
4	6,68	7,13	5,30E+06	n.d.	3,10E+07	1,30E+05	1,20E+05
5	6,71	7,04	3,40E+06	n.d.	1,70E+07	1,20E+05	4,90E+04
6	6,67	6,99	1,70E+06	n.d.	5,60E+06	7,70E+04	2,50E+04
8	6,68	6,92	2,40E+06	n.d.	1,70E+07	3,80E+04	2,70E+04
10	6,65	6,79	1,20E+06	n.d.	8,10E+06	2,60E+04	2,10E+04
12	6,74	6,78	1,90E+05	n.d.	4,30E+06	1,50E+04	1,40E+04
14	6,50	6,82	1,90E+05	n.d.	4,80E+06	1,10E+04	1,40E+04
18	6,32	6,74	6,50E+04	n.d.	1,90E+06	5,00E+03	2,00E+04
22	6,63	6,67	6,80E+03	n.d.	1,70E+06	2,10E+03	8,50E+03
26	6,63	6,59	9,20E+02	n.d.	1,20E+06	2,80E+03	5,00E+03
30	6,60	6,47	2,40E+02	2,30E+04	1,10E+06	4,70E+03	6,80E+03
34	6,77	6,54	1,90E+02	9,00E+03	9,20E+05	1,50E+03	8,80E+03
38	6,70	6,55	n.n.	4,00E+03	6,90E+05	1,10E+03	4,30E+03
42	6,54	6,23	n.n.	4,00E+03	5,40E+05	2,30E+02	5,10E+03
46	6,75	6,47	n.d.	2,30E+03	6,00E+05	2,10E+02	2,30E+03
50	6,85	6,39	n.d.	1,50E+03	4,90E+05	1,50E+02	2,30E+03
52	6,64	6,29	n.d.	2,10E+03	4,10E+05	3,00E+01	3,00E+03

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen KP	0,029	0,026-0,033
Salmonellen MPN	0,008	0,006-0,011

Tabelle 20b: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. KP (KBE/ml)	Salm. MPN (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,04	7,18	1,40E+07	n.d.	3,90E+07	4,20E+05	2,50E+05
1	7,17	7,26	1,10E+07	n.d.	3,10E+07	3,80E+05	1,60E+05
2	6,89	7,24	1,40E+07	n.d.	7,60E+07	3,30E+05	1,00E+05
3	6,74	7,21	9,90E+06	n.d.	2,90E+07	2,70E+05	8,90E+04
4	6,73	7,11	6,20E+06	n.d.	4,50E+07	2,00E+05	9,70E+04
5	6,82	7,19	5,10E+06	n.d.	3,60E+07	1,90E+05	5,70E+04
6	6,72	7,09	2,70E+06	n.d.	1,40E+07	9,20E+04	3,20E+04
8	6,63	7,17	2,20E+06	n.d.	9,70E+06	5,10E+04	2,70E+04
10	6,69	7,20	1,60E+06	n.d.	7,10E+06	2,60E+04	1,80E+04
12	6,64	7,11	7,20E+05	n.d.	1,50E+07	1,70E+03	1,40E+04
14	6,49	7,10	6,10E+04	n.d.	2,50E+06	5,60E+03	9,10E+03
18	6,31	7,22	3,60E+04	n.d.	1,80E+06	3,60E+03	1,50E+04
22	6,50	7,23	4,50E+03	n.d.	9,50E+05	4,50E+03	1,10E+04
26	6,60	7,19	1,70E+03	n.d.	9,00E+05	4,90E+03	1,00E+04
30	6,61	6,99	5,30E+02	1,50E+04	8,90E+05	3,80E+03	1,00E+04
34	6,75	6,98	1,40E+02	2,30E+04	8,70E+05	1,60E+03	8,80E+03
38	6,70	6,74	n.n.	2,00E+04	8,20E+05	1,10E+03	6,50E+03
42	6,61	7,04	n.n.	2,30E+04	7,30E+05	3,20E+02	5,60E+03
46	6,91	6,94	n.d.	1,50E+04	4,70E+05	1,70E+02	4,30E+03
50	6,78	6,65	n.d.	4,00E+03	5,90E+05	9,00E+01	2,90E+03
52	6,70	6,51	n.d.	2,30E+02	2,40E+05	1,20E+02	2,80E+03

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen KP	0,029	0,026-0,033
Salmonellen MPN	0,018	0,010-0,157

Tabelle 21a: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Substrates der Lagune nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. KP (KBE/ml)	Salm. MPN (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,80	3,96	3,00E+07	n.d.	4,60E+07	3,10E+04	2,30E+04
1	7,67	4,07	1,30E+07	n.d.	2,20E+07	2,20E+03	1,40E+04
2	7,84	3,89	2,30E+07	n.d.	2,90E+07	3,70E+03	2,20E+04
3	7,47	3,81	1,20E+07	n.d.	2,60E+07	1,80E+02	1,00E+04
4	7,40	3,79	9,20E+06	n.d.	1,50E+07	1,30E+02	9,70E+03
5	7,46	3,85	9,60E+06	n.d.	1,40E+07	1,40E+02	1,10E+04
6	7,40	3,92	5,90E+06	n.d.	1,70E+07	9,50E+01	1,70E+04
8	7,50	3,89	4,50E+06	n.d.	1,50E+07	2,70E+01	1,30E+04
10	8,13	3,84	1,50E+06	n.d.	6,30E+06	9,10E+00	4,50E+03
12	7,98	3,71	4,50E+04	n.d.	7,40E+06	n.n.	2,20E+03
14	7,47	3,80	1,60E+05	n.d.	6,90E+06	n.n.	4,00E+03
18	7,40	3,87	3,50E+04	n.d.	2,70E+06	n.n.	4,90E+03
22	7,46	3,73	4,80E+03	n.d.	2,70E+06	n.n.	2,70E+03
26	7,57	3,69	1,00E+03	9,00E+04	2,30E+06	n.n.	1,90E+03
30	7,65	3,61	5,60E+01	1,10E+04	2,10E+06	n.d.	1,70E+03
34	8,13	3,65	n.n.	4,00E+03	2,00E+06	n.d.	1,60E+03
38	8,08	3,75	n.n.	2,00E+03	2,30E+06	n.d.	8,30E+02
42	8,04	3,72	n.d.	4,00E+03	1,90E+06	n.d.	5,50E+02
46	8,28	3,63	n.d.	2,30E+03	7,10E+05	n.d.	4,50E+02
50	8,20	3,79	n.d.	4,00E+02	1,10E+06	n.d.	5,20E+02
52	8,09	3,58	n.d.	2,00E+01	6,90E+05	n.d.	3,60E+02

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen KP	0,034	0,013-0,031
Salmonellen MPN	0,018	0,013-0,031

Tabelle 21b: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 7°C gelagerten Substrates der Lagune nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. KP (KBE/ml)	Salm. MPN (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,80	3,96	3,10E+07	n.d.	4,60E+07	3,10E+04	2,30E+04
1	7,52	4,01	1,20E+07	n.d.	2,60E+07	5,50E+03	2,20E+04
2	7,67	3,98	1,80E+07	n.d.	3,80E+07	4,30E+03	1,60E+04
3	7,47	3,92	1,10E+07	n.d.	3,60E+07	1,20E+03	9,20E+03
4	7,38	3,97	1,40E+07	n.d.	2,20E+07	1,90E+03	1,20E+04
5	7,46	3,80	1,60E+07	n.d.	1,70E+07	1,40E+03	1,00E+04
6	7,41	3,99	5,50E+06	n.d.	1,50E+07	4,50E+02	1,30E+04
8	7,69	4,03	5,20E+06	n.d.	1,60E+07	3,00E+02	1,10E+04
10	7,99	3,93	4,20E+06	n.d.	1,10E+07	1,50E+01	7,50E+03
12	7,84	3,68	1,30E+06	n.d.	8,10E+06	6,00E+00	2,90E+03
14	7,32	4,12	2,20E+05	n.d.	1,10E+07	n.n.	7,40E+03
18	7,40	3,85	4,20E+04	n.d.	3,70E+06	n.n.	6,30E+03
22	7,38	3,82	2,40E+03	n.d.	1,60E+06	n.n.	2,70E+03
26	7,57	3,75	2,80E+02	n.d.	2,60E+06	n.n.	2,60E+03
30	7,55	3,60	2,40E+02	2,30E+04	2,10E+06	n.d.	2,10E+03
34	7,67	3,70	1,10E+02	9,00E+03	2,00E+06	n.d.	1,90E+03
38	7,83	3,78	5,20E+01	4,00E+03	1,70E+06	n.d.	1,20E+03
42	7,88	3,67	n.n.	4,00E+03	1,50E+06	n.d.	8,90E+02
46	8,27	3,72	n.n.	9,00E+02	7,40E+05	n.d.	6,10E+02
50	8,34	3,77	n.d.	4,00E+02	1,40E+06	n.d.	4,70E+02
52	8,04	3,62	n.d.	2,30E+02	1,00E+06	n.d.	5,20E+02

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen KP	0,028	0,026-0,031
Salmonellen MPN	0,013	0,011-0,015

Tabelle 22a: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 7°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. KP (KBE/ml)	Salm. MPN (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,65	8,55	2,90E+07	n.d.	8,10E+07	1,30E+05	2,70E+05
1	7,35	8,74	5,90E+05	n.d.	3,20E+07	7,40E+04	1,10E+05
2	7,51	8,53	7,10E+05	n.d.	3,90E+07	5,50E+04	5,10E+04
3	7,31	8,40	4,10E+05	n.d.	8,00E+06	4,20E+04	2,30E+04
4	7,27	8,43	2,20E+05	n.d.	1,30E+07	3,30E+04	4,40E+04
5	7,29	8,49	5,80E+05	n.d.	4,00E+06	1,50E+04	2,40E+04
6	7,24	8,47	2,10E+05	n.d.	1,20E+07	1,90E+04	2,10E+04
8	7,18	8,37	3,10E+04	n.d.	4,70E+06	1,70E+04	1,80E+04
10	7,18	8,34	7,90E+04	n.d.	2,30E+06	9,10E+03	1,50E+04
12	7,35	8,42	1,20E+04	n.d.	2,70E+06	3,90E+03	1,50E+04
14	6,91	8,31	3,50E+04	n.d.	1,50E+06	3,10E+03	1,70E+04
18	7,01	8,21	1,20E+03	n.d.	1,20E+05	4,10E+02	1,30E+04
22	6,89	8,30	1,00E+03	n.d.	2,30E+05	6,00E+02	1,30E+04
26	6,99	8,14	6,40E+02	1,10E+04	1,20E+05	4,40E+02	1,60E+04
30	7,05	8,04	4,50E+01	5,00E+03	1,40E+05	6,70E+02	8,40E+03
34	7,34	8,04	n.n.	1,10E+03	1,20E+05	5,00E+02	9,60E+03
38	7,49	8,12	n.n.	2,00E+03	6,60E+04	1,10E+02	6,30E+03
42	7,57	7,99	n.d.	7,00E+02	7,20E+04	3,00E+01	5,40E+03
46	8,12	8,06	n.d.	2,00E+02	8,70E+04	4,50E+01	1,80E+03
50	7,02	8,11	n.d.	5,00E+02	6,80E+04	1,80E+01	2,40E+03
52	7,65	7,89	n.d.	4,00E+01	5,10E+04	1,40E+01	2,10E+03

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen KP	0,030	0,026-0,035
Salmonellen MPN	0,013	0,010-0,020

Tabelle 22b: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der bei 7°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. KP (KBE/ml)	Salm. MPN (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,64	7,03	2,20E+07	n.d.	3,40E+07	5,40E+04	1,10E+05
1	7,36	6,49	5,00E+06	n.d.	3,20E+07	3,90E+04	6,20E+04
2	7,45	6,34	2,40E+06	n.d.	4,40E+07	3,50E+04	4,10E+04
3	7,19	6,25	4,00E+05	n.d.	7,90E+07	3,00E+04	1,80E+04
4	7,08	6,24	4,10E+05	n.d.	4,50E+07	2,50E+04	4,10E+04
5	7,24	6,19	1,60E+05	n.d.	3,80E+06	1,00E+04	1,90E+04
6	7,13	6,13	2,60E+05	n.d.	1,90E+06	6,00E+03	2,00E+04
8	7,21	6,02	2,30E+05	n.d.	1,60E+06	6,40E+03	1,80E+04
10	7,31	5,89	7,00E+04	n.d.	3,00E+06	5,00E+03	1,60E+04
12	7,30	5,82	2,20E+04	n.d.	6,30E+06	1,70E+03	9,50E+03
14	6,87	5,91	1,30E+04	n.d.	2,00E+06	1,90E+03	1,40E+04
18	6,94	5,97	2,50E+03	n.d.	1,30E+05	4,50E+02	9,50E+03
22	6,89	6,04	5,70E+02	2,00E+04	1,90E+05	3,20E+02	9,80E+03
26	6,91	6,00	4,50E+01	1,10E+04	7,70E+04	3,70E+02	1,10E+04
30	7,07	6,02	n.n.	9,00E+03	1,20E+05	3,60E+02	7,30E+03
34	7,12	5,92	n.n.	2,30E+03	1,20E+05	1,50E+02	8,20E+03
38	7,24	6,02	n.n.	9,00E+02	8,60E+04	1,50E+02	4,40E+03
42	7,11	5,62	n.d.	1,10E+03	2,70E+04	1,80E+01	4,50E+03
46	7,62	5,60	n.d.	7,00E+02	6,00E+04	1,40E+01	3,40E+03
50	6,69	5,54	n.d.	2,30E+02	4,70E+04	1,40E+01	1,80E+03
52	7,31	5,78	n.d.	9,00E+01	3,90E+04	4,50E+00	2,70E+03

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen KP	0,034	0,030-0,038
Salmonellen MPN	0,011	0,009-0,013

Tabelle 23a: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	6,86	5,54	4,00E+07	1,20E+08	8,20E+04	1,00E+06
1	6,43	5,34	3,80E+06	1,70E+07	2,10E+04	6,00E+04
2	6,22	6,12	2,30E+05	2,30E+06	9,80E+03	8,20E+03
3	6,59	5,54	7,00E+04	1,10E+06	7,00E+03	4,20E+03
4	6,73	5,26	1,50E+04	1,10E+06	2,70E+03	3,70E+03
5	6,67	5,15	2,00E+04	1,40E+06	1,00E+03	2,20E+03
6	6,81	5,27	9,00E+02	1,20E+06	2,30E+02	1,10E+03
7	7,38	5,17	4,00E+00	8,40E+05	4,50E+01	4,60E+02
8	7,52	5,34	2,10E+00	1,80E+06	2,30E+01	1,00E+02
9	7,75	5,03	n.n.	1,40E+06	4,50E+00	3,20E+01
10	7,7	4,94	n.n.	2,30E+06	n.n.	4,50E+01
11	7,61	4,7	n.d.	6,00E+06	n.d.	8,60E+01

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen	0,136	0,121-0,155

Tabelle 23b: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	6,86	8,14	1,50E+08	1,60E+08	4,10E+05	1,60E+06
1	6,33	7,88	2,30E+07	3,10E+07	9,10E+04	6,20E+04
2	6,68	7,68	5,00E+06	1,30E+05	2,90E+04	1,40E+04
3	6,73	7,53	2,30E+06	6,30E+06	1,40E+04	9,10E+03
4	6,61	7,59	9,00E+03	1,60E+06	3,00E+03	4,70E+03
5	6,55	7,63	9,00E+02	7,80E+05	2,50E+02	3,00E+03
6	6,72	7,26	1,50E+02	7,50E+05	1,00E+02	1,50E+03
7	7,18	7,32	n.n.	9,90E+05	n.n.	1,50E+03
8	7,14	7,30	n.n.	5,20E+05	n.n.	1,20E+03
9	7,65	7,09	n.n.	7,00E+05	n.n.	2,20E+02
10	7,70	6,79	n.d.	8,50E+05	n.d.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen	0,181	0,157-0,214

Tabelle 24a: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Substrates der Lagune der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,80	3,96	2,10E+07	4,60E+07	3,10E+04	2,30E+04
1	7,72	3,83	3,80E+06	9,60E+06	1,50E+03	9,80E+03
2	7,69	3,91	9,00E+05	2,70E+06	1,40E+02	1,90E+03
3	7,46	3,82	1,50E+04	3,20E+06	n.n.	4,90E+02
4	7,67	3,81	9,00E+02	2,30E+06	n.n.	3,30E+02
5	7,93	3,72	9,00E+01	1,10E+06	n.n.	1,40E+02
6	7,59	3,64	n.n.	1,60E+06	n.d.	2,90E+02
7	7,84	3,58	n.n.	1,70E+06	n.d.	4,50E+01
8	7,58	3,58	n.n.	2,40E+06	n.d.	3,60E+01

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen	0,187	0,161-0,222

Tabelle 24b: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 22°C gelagerten Substrates der Lagune der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,80	3,96	2,10E+07	4,60E+07	3,10E+04	2,30E+04
1	7,74	3,92	4,00E+06	9,00E+06	7,70E+02	7,30E+03
2	7,51	4,02	7,00E+04	2,40E+06	n.n.	1,40E+03
3	7,51	3,87	1,50E+04	3,00E+06	n.n.	5,90E+02
4	7,70	3,84	1,40E+03	1,30E+06	n.n.	2,40E+02
5	7,82	3,94	9,00E+01	9,90E+05	n.n.	1,40E+02
6	7,74	3,83	9,00E-01	1,80E+06	n.d.	2,60E+02
7	7,67	3,80	n.n.	1,60E+06	n.d.	8,60E+01
8	7,58	3,78	n.n.	5,60E+06	n.d.	1,10E+02

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen	0,170	0,155-0,188

Tabelle 25a: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen von bei 22°C gelagerter Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,65	8,55	2,90E+07	8,10E+07	1,30E+05	2,70E+05
1	7,24	8,49	4,00E+05	1,90E+07	1,00E+04	5,40E+04
2	7,30	8,59	3,80E+04	1,70E+07	2,70E+03	2,80E+04
3	7,21	8,51	9,00E+01	3,30E+06	4,20E+02	1,40E+04
4	7,43	8,39	5,00E+01	2,70E+05	6,40E+01	8,50E+03
5	7,44	8,59	9,00E+00	1,50E+05	4,50E+00	3,30E+03
6	7,31	8,09	n.n.	1,20E+05	n.n.	9,50E+02
7	7,46	8,09	n.n.	3,60E+05	n.n.	2,00E+02
8	7,69	7,83	n.d.	1,20E+06	n.d.	6,80E+00

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

D-Wert (Zehnerpotenzen/d)		95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen		0,189
		0,163-0,224

Tabelle 25b: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen von bei 22°C gelagerter Rindergülle der Milchviehanlage II nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

Zeit (Wochen)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,54	7,03	2,30E+07	3,40E+07	5,40E+04	1,10E+05
1	7,00	6,78	4,00E+05	1,20E+07	8,50E+03	4,00E+04
2	7,04	6,70	9,00E+04	3,40E+06	3,20E+03	1,40E+04
3	7,01	6,88	2,80E+03	8,90E+06	4,20E+02	9,60E+03
4	7,17	6,90	1,10E+03	2,70E+05	1,20E+02	6,60E+03
5	7,43	6,83	2,00E+01	1,00E+05	9,10E+00	2,20E+03
6	7,39	6,78	1,50E+00	9,50E+04	n.n.	7,10E+02
7	7,73	6,56	n.n.	7,40E+04	n.n.	6,40E+01
8	7,63	6,20	n.n.	2,20E+05	n.d.	2,70E+01

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

Tabelle 26a: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 37°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104

Zeit (Tage)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	7,00	6,08	5,00E+07	1,90E+08	1,80E+05	4,50E+05
2	6,93	5,89	3,80E+06	7,50E+06	5,60E+04	1,80E+06
4	7,10	5,48	2,10E+03	9,10E+05	8,20E+03	1,80E+05
6	7,32	5,32	7,00E+02	5,70E+05	5,90E+02	4,60E+04
8	7,35	4,86	5,00E+01	9,10E+05	n.n.	8,20E+02
10	7,79	4,84	1,10E+00	2,10E+06	n.n.	1,20E+03
12	7,34	4,78	1,50E-01	3,10E+06	n.n.	4,50E+04
14	7,38	4,62	n.n.	6,70E+06	n.n.	1,40E+04
16	7,33	4,50	n.n.	5,20E+07	n.n.	1,10E+04

D-Wert (Zehnerpotenzen/d)		95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen	0,633	0,527-0,792

Tabelle 26b: Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen des bei 37°C gelagerten Rinderflüssigmistes der Milchviehanlage I nach Zugabe von *S. Typhimurium* DT104 (Versuchswiederholung)

Zeit (Tage)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)	GesamtKZ (KBE/ml)	E.coli (KBE/ml)	Enterokokken (KBE/ml)
0	6,89	7,98	1,10E+08	1,40E+08	3,60E+05	1,70E+06
2	6,73	7,86	3,80E+07	3,10E+07	9,10E+04	1,80E+05
4	6,86	7,66	1,50E+06	2,40E+06	1,50E+04	9,00E+05
6	7,13	7,72	7,00E+02	1,60E+06	5,50E+02	3,40E+04
8	7,39	7,47	1,50E+00	8,70E+05	n.n.	2,10E+03
10	7,34	7,50	7,00E-02	2,60E+06	n.n.	8,20E+02
12	7,72	7,41	n.n.	8,90E+06	n.n.	4,50E+02
14	7,79	7,20	n.n.	2,70E+07	n.n.	3,20E+01
16	7,92	7,11	n.n.	4,40E+07	n.n.	3,20E+01
18	7, 85	6,64	n.n.	6,40E+07	n.d.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar, n.d.: nicht durchgeführt

D-Wert (Zehnerpotenzen/d)		95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Salmonellen	0,721	0,549-1,053

Tabelle 27: Überlebenszeiten von *S. Typhimurium* DT104 in der bei 22°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage I

Zeit	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)
0 Tage	7,10	9,82	3,80E+06
2 Tage	7,28	9,34	9,00E+06
7 Tage	7,14	9,03	4,00E+04
10 Tage	6,70	8,62	2,30E+04
2 Wochen	6,66	8,66	3,00E+03
3 Wochen	6,50	8,29	2,10E+03
4 Wochen	6,60	8,28	2,00E+02
5 Wochen	6,42	8,32	2,30E-01
6 Wochen	6,39	8,24	4,00E-01
7 Wochen	6,31	8,69	n.n.
8 Wochen	6,52	8,45	n.n.
Wiederholung 1			
Zeit	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)
0 Tage	7,02	11,41	3,80E+07
2 Tage	6,78	11,20	3,80E+07
7 Tage	6,69	11,06	7,00E+06
10 Tage	6,58	10,84	1,10E+05
2 Wochen	6,50	10,89	7,00E+04
3 Wochen	6,43	10,76	2,10E+04
4 Wochen	6,28	10,87	1,10E+03
5 Wochen	6,69	10,69	1,50E+02
6 Wochen	6,23	10,57	4,00E+00
7 Wochen	6,40	10,36	4,00E-01
8 Wochen	6,24	10,67	4,00E-01
9 Wochen	6,20	10,35	n.n.
10 Wochen	6,28	10,20	n.n.

(Fortsetzung folgt)

Tabelle 27: (Fortsetzung)

Wiederholung 2			
Zeit	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)
0 Tage	7,18	8,75	4,00E+07
2 Tage	6,87	8,39	1,50E+06
7 Tage	6,65	8,42	2,30E+06
10 Tage	6,51	8,34	7,00E+05
2 Wochen	6,41	8,11	1,10E+05
2 Wochen	6,40	8,32	3,80E+03
3 Wochen	6,32	8,19	5,00E+02
4 Wochen	6,46	8,05	4,00E+01
5 Wochen	6,32	7,89	2,30E-01
6 Wochen	6,22	8,09	4,00E-02
7 Wochen	6,38	8,03	n.n.
8 Wochen	6,35	7,97	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Versuch	0,162	0,139-0,194
Wiederholung 1	0,142	0,127-0,159
Wiederholung 2	0,188	0,161-0,225

Tabelle 28: Überlebenszeiten von *S. Typhimurium* DT104 in der bei 37°C gelagerten Rindergülle der Milchviehanlage I

Zeit (Tage)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)
0	7,21	9,51	3,00E+07
2	7,54	8,70	5,00E+06
4	7,86	8,97	4,00E+01
6	8,00	8,28	9,00E-01
8	7,89	7,91	n.n.
10	7,83	7,73	n.n.
12	7,94	7,48	n.n.
Wiederholung 1			
Zeit (Tage)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)
0	7,53	11,23	9,00E+07
2	7,43	11,05	3,80E+06
4	7,52	10,76	5,00E+04
6	7,50	10,23	3,80E+03
8	7,88	9,91	1,10E+02
10	7,74	10,10	7,00E-02
12	7,65	9,82	n.n.
Wiederholung 2			
Zeit (Tage)	pH-Wert	TS (%)	Salm. (KBE/ml)
0	7,38	8,52	2,10E+07
2	7,24	8,37	1,10E+06
4	7,35	8,04	4,00E+04
6	7,48	7,62	5,00E+01
8	7,62	7,51	4,00E-02
10	7,68	7,21	n.n.
12	7,56	6,79	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Versuch	0,978	0,697-1,634
Wiederholung 1	0,839	0,739-0,969
Wiederholung 2	0,907 Tage	0,717-1,234

Tabelle 29: Überleben von *S. Typhimurium* DT104 in geschlossenen Behältnissen in Rindergülle bei einer Lagerungstemperatur von 37°C

Lagerzeit (Wochen)	Salmonellen in KBE/ml		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
0	4,40E+08	3,70E+09	1,20E+09
1	7,10E+07	6,10E+07	3,20E+07
2	7,50E+06	2,10E+07	1,90E+07
3	1,10E+06	1,10E+07	6,20E+06
4	4,70E+06	2,40E+06	2,10E+06
5	2,20E+06	1,40E+06	1,50E+06
6	5,70E+05	7,50E+05	5,10E+06
7	7,90E+05	2,30E+06	4,20E+06
8	2,00E+05	1,50E+06	1,20E+06
9	8,90E+05	1,00E+06	8,70E+05
10	1,40E+06	3,80E+05	6,50E+05
11	8,70E+05	3,40E+05	6,70E+05
12	1,00E+05	2,30E+05	9,70E+05
13	9,10E+05	5,60E+05	1,30E+06
14	1,20E+06	4,30E+05	8,10E+05
15	3,10E+05	6,00E+05	1,10E+05
17	1,20E+05	3,90E+05	7,00E+05
19	3,80E+05	1,20E+05	5,00E+05
21	9,80E+04	1,50E+05	1,90E+05
23	2,50E+05	3,20E+05	2,10E+05
25	1,70E+05	1,80E+05	7,20E+04
27	8,20E+04	1,00E+05	1,30E+05
29	8,40E+04	1,20E+05	3,80E+05
31	6,30E+04	8,60E+04	1,20E+05
33	6,90E+04	1,10E+05	4,30E+04
35	4,00E+04	7,40E+04	1,70E+04
37	4,60E+04	7,30E+04	1,90E+04
39	3,90E+04	3,30E+04	1,50E+04
41	3,10E+04	5,90E+04	4,10E+03
43	6,00E+04	6,20E+04	5,80E+03

(Fortsetzung folgt)

Tabelle 29: (Fortsetzung)

45	3,90E+04	9,30E+04	2,20E+04
47	5,20E+04	4,50E+04	1,30E+04
49	4,10E+04	4,00E+04	3,90E+03
51	3,70E+04	7,40E+03	4,20E+03
53	5,80E+04	1,10E+04	2,70E+03
55	4,80E+04	2,50E+04	1,10E+04
57	3,90E+04	2,00E+04	3,80E+03
59	8,40E+03	7,10E+04	4,10E+03
61	9,50E+03	9,10E+03	1,00E+04
63	1,70E+03	2,10E+03	1,20E+04
65	6,30E+03	1,10E+04	2,90E+03

Salmonellen	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Versuch	0,009	0,007-0,011
Wiederholung 1	0,010	0,008-0,012
Wiederholung 2	0,010	0,009-0,012

Tabelle 30: Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Ameisensäure gegen *S. Typhimurium* DT104

Zeit	Konzentrationen					
	0,625 g/l	1,25 g/l	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l
2 Stunden	+	+	+	+	+	+
1 Tag	+	+	+	+	+	+
2 Tage	+	+	+	+	+	+
4 Tage	+	+	+	+	+	-
6 Tage	+	+	+	+	+	-
8 Tage	+	+	+	+	+	-
10 Tage	+	+	+	+	+	-
12 Tage	+	+	+	+	+	-
14 Tage	+	+	+	+	+	-
16 Tage	+	+	+	+	+	-
18 Tage	+	+	+	+	+	-

+: S. nachweisbar, -: S. nicht nachweisbar

Tabelle 31: Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Essigsäure gegen *S. Typhimurium* DT104

	Konzentrationen						
	1,25 g/l	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l	40 g/l	80 g/l
2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+
1 Tag	+	+	+	+	+	+	+
2 Tage	+	+	+	+	+	+	-
4 Tage	+	+	+	+	+	+	-
6 Tage	+	+	+	+	+	-	-
8 Tage	+	+	+	+	+	-	-
10 Tage	+	+	+	+	+	-	-
12 Tage	+	+	+	+	+	-	-
14 Tage	+	+	+	+	+	-	-
16 Tage	+	+	+	+	+	-	-
18 Tage	+	+	+	+	+	-	-

+: S. nachweisbar, -: S. nicht nachweisbar

Tabelle 32: Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Propionsäure gegen *S. Typhimurium* DT104

Zeit	Konzentrationen						
	0,625 g/l	1,25 g/l	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l	40 g/l
2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+
1 Tag	+	+	+	+	+	+	+
2 Tage	+	+	+	+	+	+	-
4 Tage	+	+	+	+	+	+	-
6 Tage	+	+	+	+	+	+	-
8 Tage	+	+	+	+	+	+	-
10 Tage	+	+	+	+	+	+	-
12 Tage	+	+	+	+	+	+	-
14 Tage	+	+	+	+	+	+	-
16 Tage	+	+	+	+	+	+	-
18 Tage	+	+	+	+	+	+	-

+: S. nachweisbar, -: S. nicht nachweisbar

Tabelle 33: Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Buttersäure gegen *S. Typhimurium* DT104

Zeit	Konzentrationen						
	1,25 g/l	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l	40 g/l	80 g/l
2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+
1 Tag	+	+	+	+	+	+	+
2 Tage	+	+	+	+	+	+	-
4 Tage	+	+	+	+	+	-	-
6 Tage	+	+	+	+	+	-	-
8 Tage	+	+	+	+	+	-	-
10 Tage	+	+	+	+	-	-	-
12 Tage	+	+	+	+	-	-	-
14 Tage	+	+	+	+	-	-	-
16 Tage	+	+	+	+	-	-	-
18 Tage	+	+	+	+	-	-	-

+: S. nachweisbar, -: S. nicht nachweisbar

Tabelle 34: Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Isobuttersäure gegen *S. Typhimurium* DT104

Zeit	Konzentrationen							
	0,625 g/l	1,25 g/l	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l	40 g/l	80 g/l
2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Tag	+	+	+	+	+	+	+	+
2 Tage	+	+	+	+	+	+	+	-
4 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
6 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
8 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
10 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
12 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
14 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
16 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
18 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-

+: S. nachweisbar, -: S. nicht nachweisbar

Tabelle 35: Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Valeriansäure gegen *S. Typhimurium* DT104

Zeit	Konzentrationen							
	0,625 g/l	1,25 g/l	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l	40 g/l	80 g/l
2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	-
1 Tag	+	+	+	+	+	+	-	-
2 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
4 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
6 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
8 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
10 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
12 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
14 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
16 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
18 Tage	+	+	+	+	-	-	-	-

+: S. nachweisbar, -: S. nicht nachweisbar

Tabelle 36: Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Isovaleriansäure gegen *S. Typhimurium* DT104

Zeit	Konzentrationen							
	0,625 g/l	1,25 g/l	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l	40 g/l	80 g/l
2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	+
1 Tag	+	+	+	+	+	+	+	-
2 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
4 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
6 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
8 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
10 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
12 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
14 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
16 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
18 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-

+: S. nachweisbar, -: S. nicht nachweisbar

Tabelle 37: Semiquantitative Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Milchsäure gegen *S. Typhimurium* DT104

Zeit	Konzentrationen						
	1,25 g/l	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l	40 g/l	80 g/l
2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+
1 Tag	+	+	+	+	+	+	+
2 Tage	+	+	+	+	+	+	+
4 Tage	+	+	+	+	+	+	-
6 Tage	+	+	+	+	+	+	-
8 Tage	+	+	+	+	+	-	-
10 Tage	+	+	+	+	+	-	-
12 Tage	+	+	+	+	+	-	-
14 Tage	+	+	+	+	-	-	-
16 Tage	+	+	+	+	-	-	-
18 Tage	+	+	+	+	-	-	-

+: S. nachweisbar, -: S. nicht nachweisbar

Tabelle 38: Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 in verschiedenen Essigsäurekonzentrationen

Zeit (Tage)	Konzentrationen						
	5 g/l	10 g/l	15 g/l	20 g/l	30 g/l	40 g/l	60 g/l
0	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06
2	1,60E+06	3,20E+06	3,20E+06	3,60E+06	1,70E+06	3,60E+06	4,80E+05
4	9,40E+05	1,50E+06	3,40E+06	2,00E+06	1,20E+06	1,90E+04	1,70E+03
7	9,00E+05	1,60E+07	2,10E+06	1,80E+06	1,50E+06	4,50E+00	1,80E+00
10	6,00E+05	1,00E+07	1,80E+06	1,60E+06	7,80E+05	n.n.	n.n.
13	4,60E+05	1,20E+07	1,40E+06	1,50E+06	8,30E+05	n.n.	n.n.
16	4,50E+05	8,10E+06	1,70E+06	1,90E+06	2,50E+05	n.n.	n.n.
20	3,10E+05	6,40E+06	1,30E+06	1,00E+05	9,50E+04	n.n.	n.n.
24	1,80E+05	7,90E+06	1,00E+06	8,20E+05	8,20E+04	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

(Fortsetzung folgt)

Tabelle 38: Fortsetzung

Salmonellen	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Essigsäure 5 g/l	0,053	0,042- -0,073
Essigsäure 10 g/l	-0,086	0,173- -0,035
Essigsäure 15 g/l	0,028	0,002-0,036
Essigsäure 20 g/l	0,079	0,047-0,245
Essigsäure 30 g/l	0,074	0,081-0,094
Essigsäure 40 g/l	0,504	0,344-0,942
Essigsäure 60 g/l	0,474	0,319-0,918

Tabelle 39: Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 in verschiedenen Essigsäurekonzentrationen (Versuchswiederholung)

Zeit (Tage)	Konzentrationen						
	5 g/l	10 g/l	15 g/l	20 g/l	30 g/l	40 g/l	60 g/l
0	6,40E+06	6,40E+06	6,40E+06	6,40E+06	6,40E+06	6,40E+06	6,40E+06
2	7,30E+06	6,20E+06	3,40E+06	4,90E+06	3,00E+06	8,30E+05	1,80E+05
4	5,30E+06	5,40E+06	3,20E+06	4,20E+06	2,80E+06	2,00E+04	2,70E+03
7	3,10E+06	1,50E+07	1,40E+07	1,80E+06	1,20E+06	n.n.	n.n.
10	2,50E+06	8,70E+06	8,40E+06	1,60E+06	8,50E+05	n.n.	n.n.
13	2,40E+06	3,60E+06	4,50E+06	1,30E+06	5,30E+05	n.n.	n.n.
16	1,80E+06	3,10E+06	4,30E+06	1,50E+06	2,70E+05	n.n.	n.n.
20	1,90E+06	1,80E+06	1,50E+06	1,00E+06	1,40E+05	n.n.	n.n.
24	1,70E+06	1,40E+06	1,10E+06	1,10E+06	6,90E+04	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Salmonellen	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Essigsäure 5 g/l	0,033	0,025-0,046
Essigsäure 10 g/l	0,050	0,032-0,199
Essigsäure 15 g/l	0,067	0,035-0,870
Essigsäure 20g/l	0,040	0,030-0,061
Essigsäure 30 g/l	0,080	0,075-0,085
Essigsäure 40 g/l	0,540	0,345-1,239
Essigsäure 60 g/l	0,511	0,325-1,192

Tabelle 40: Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 in verschiedenen Propionsäurekonzentrationen

Zeit (Tage)	Konzentrationen			
	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l
0	5,00E+06	5,00E+06	5,00E+06	5,00E+06
2	4,50E+06	3,50E+06	4,00E+06	1,70E+06
4	4,90E+06	3,20E+06	2,90E+06	6,60E+05
7	4,10E+06	1,90E+06	2,40E+06	8,60E+04
10	4,00E+06	1,50E+06	2,80E+06	2,00E+05
13	3,40E+06	1,10E+06	1,90E+06	6,30E+05
16	3,10E+06	1,10E+06	1,80E+06	6,90E+06
20	2,50E+06	1,30E+06	1,80E+06	3,70E+06
24	2,20E+06	1,00E+06	1,10E+06	3,80E+06

Salmonellen	D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Propionsäure 2,5 g/l	0,016	0,014-0,018
Propionsäure 5 g/l	0,034	0,025-0,053
Propionsäure 10 g/l	0,025	0,020-0,034
Propionsäure 20 g/l	-0,269	0,198- -0,080

Tabelle 41: Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 in verschiedenen Buttersäurekonzentrationen

Zeit (Tage)	Konzentrationen			
	2,5 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l
0	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06
2	2,60E+06	2,70E+06	3,40E+06	3,50E+06
4	2,30E+06	2,40E+06	2,40E+06	3,20E+06
7	2,40E+06	1,80E+06	1,90E+06	2,50E+06
10	1,90E+06	2,00E+06	1,70E+06	1,20E+06
13	2,10E+06	7,60E+05	1,70E+06	3,30E+05
16	1,80E+06	3,50E+05	9,20E+05	9,90E+04
20	1,20E+06	3,30E+05	9,30E+05	1,90E+04
24	9,60E+05	1,60E+05	2,70E+05	2,30E+03
Salmonellen		D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)	
Buttersäure 2,5 g/l		0,025	0,020-0,035	
Buttersäure 5 g/l		0,062	0,052-0,075	
Buttersäure 10 g/l		0,046	0,037-0,061	
Buttersäure 20 g/l		0,146	0,122-0,181	

Tabelle 42: Quantitative Hemmung der *S. Typhimurium* DT104 in verschiedenen Valeriansäurekonzentrationen

Zeit (Tage)	Konzentrationen		
	1,25 g/l	2,5 g/l	5 g/l
0	5,90E+06	5,90E+06	5,90E+06
2	3,30E+06	4,40E+06	3,20E+06
4	3,50E+06	4,10E+06	3,60E+06
7	3,00E+06	3,20E+06	3,20E+06
10	2,30E+06	3,80E+06	2,70E+06
13	1,90E+06	3,70E+06	1,70E+06
16	8,10E+05	1,90E+06	4,10E+05
20	1,60E+05	5,50E+05	5,90E+04
24	5,60E+04	1,90E+05	1,80E+04
Salmonellen		D-Wert (Zehnerpotenzen/d)	95%-Konfidenzintervall (Zehnerpotenzen/d)
Valeriansäure 1,25 g/l		0,088	0,069-0,122
Valeriansäure 2,5 g/l		0,067	0,049-0,107
Valeriansäure 5 g/l		0,116	0,090-0,164

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als Promotionsstudent am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. habil. A. Bergmann für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung während meiner gesamten Forschungsarbeit.

Weiterhin danke ich Frau E. Brumme und allen Mitarbeitern des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei den Mitarbeitern des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institutes bedanke ich mich für die Ultrazentrifugation mehrerer Gülleproben.

Dem Amtstierarzt des Landkreises Chemnitzer Land Herrn Pintscher danke ich für die Bereitstellung der amtlich angeordneten Untersuchungsergebnisse in der Milchviehanlage in Oberlungwitz.

Für die ergänzende Untersuchung und Typisierung meiner Salmonellenisolate danke ich der Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Standort Leipzig, und dem Robert-Koch-Institut, Bereich Wernigerode.

Zu besonderem Dank bin ich den Mitarbeitern der Biogasanlage und der Milchviehanlage in Oberlungwitz für die freundliche Unterstützung der Untersuchungen verpflichtet.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann Uwe und meiner Familie, die mir durch ihre Unterstützung die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.